

ブロッキング効率の向上したタンパク質

5

技術分野

本発明は、アミノ酸配列情報を元にブロッキング能を有する新規なブロッキング用タンパク質または部分配列タンパク質候補をスクリーニングする方法に関し、更には、本発明はタンパク質のアミノ酸配列を改変することにより、ブロッキング効率の向上したタンパク質に関する。更には、該タンパク質を含有する、ブロッキング試薬、安定化剤、賦形剤、フォールディング補助剤、リフォールディング補助剤、医療用コーティング剤にも関する。本発明は、大腸菌での高発現可能なタンパク質のブロッキング効率を向上させることができ、ブロッキング効率に優れたタンパク質を組換えで大量に生産する場合有用である。

15

背景技術

従来、免疫測定などで用いられるブロッキング剤としては生体成分から直接抽出したタンパク質が多く使用されてきた。特にウシ由来のアルブミンやカゼインなどが広く使用されてきた歴史がある。しかし近年、狂牛病などの問題から、様々な制限が加えられている現状である。一方、組換え体を用いてそれらを製造する方法は、病原体（物質）を排除できる利点はあるが、生産性などの問題点から実用に至っているものは少ない。

よって、大腸菌などに由来するタンパク質を、代替タンパク質として使用するという試みが、生産性という立場からは好ましいと言える。しかし、大量発現できるタンパク質が必ずしもブロッキング効率が良いわけではなく、組換え体で生産できるブロッキング効率に優れたタンパク質を見出さなければならないという問題点があった。

近年、様々な生物の遺伝子配列が明らかとなったが、予想されるアミノ酸配列よりブロッキング効率に優れたタンパク質を見出す法則は未だ知られておらず、そのようなタンパク質を探すには非常な手間が掛かる作業であると思われていた。

このような理由から、組換え体で大量生産できるブロッキング効率に優れた代替タ

ンパク質が求められていた。

図面の簡単な説明

図1は、ブロッキング効率測定概念を示す図である。

5 図2は、タンパク質の2分割法を示す図である。

図3は、ブロッキング能を示すタンパク質のブロッキング機構を示す図である。

図4は、DnaK 384-607の立体構造を示す図である。βシート部分がN末端、αヘリックス部分がC末端に相当する。

図5は、種々のDnaK変異体の示すブロッキング効率を示す図である。図5にお
10 いて、

Blank: ブロッキングなし

384-638: DnaK384-638

384-607: DnaK384-607

384-578: DnaK384-578; αヘリックスの一部の構造が除
15 去された変異体

384-561: DnaK384-561; αヘリックスの約半分の構造が
除去された変異体

508-607: DnaK508-607; βシート部分が除去された変異
体(αヘリックスからなる)

20 525-607: DnaK525-607; βシート部分とαヘリックスの
一部が除去された変異体(αヘリックスからなる)

BSA: BSA fraction V

図6は、大腸菌DnaKタンパク質の構造、および作成した変異体の構造を示す図
である。

25 図7は、DnaK 381-553の立体構造を示す図である。

図8は、疎水ドメインを改変したタンパク質のブロッキング機構を示す図である。

図9は、種々のDnaK変異体の示すブロッキング効率を示す図である。

384-607: DnaK384-607

384-607(VAV): DnaK384-607(D479V, D48

1 V)

419-607 : DnaK419-607

BSA : BSA fraction V

Blank : ブロッキングなし

5 図10は、DnaK変異体濃度とブロッキング効果の相関を示す図である。

図11は、DnaK変異体のブロッキング速度を示す図である。

図12は、DnaK変異体のELISAのブロッキングへの応用を示す図である。

図13は、ブロッキングに頻繁に使用されるタンパク質と疎水性の高いタンパク質の親水性、疎水性アミノ酸の含有率を示す。

10 図14は、BSA、 α カゼイン、リパーゼ、DnaK384-607のN末端側とC末端側の含有アミノ酸の特徴を示す。| Δ |はN末端側とC末端側の親水疎水率の差の絶対値を示す。

図15は、ヒスチジントグなし(native)のDnaKフラグメントのブロッキング効果の比較を示す。BSA(フラクションV)は10mg/ml、native DnaK419-607フラグメントは0.5mg/mlの濃度に調整して、これを高濃度における比較として示す。また、BSA(フラクションV)は2mg/ml、native DnaK419-607フラグメントは0.1mg/mlの濃度に調整して、これを低濃度における比較として示す。

図16は、図15の高濃度におけるデータを図示したものである。

20 図17は、図15の低濃度におけるデータを図示したものである。

発明の開示

本発明の目的は、アミノ酸配列からブロッキング能を有するタンパク質を簡便に見出す方法を提供するとともに、大腸菌等で大量発現可能、かつアミノ酸配列改変によりブロッキング効率を向上させたタンパク質を提供することである。

25 上のような背景を踏まえ、鋭意検討した結果、ブロッキング能を有するタンパク質に特徴的なアミノ酸配列に関する性質を見出すと共に、そのようにして見出されたタンパク質のアミノ酸配列を改変することによりブロッキング効率を飛躍的に高めることが出来ることを見出し、本発明に至った。

すなわち本発明は、以下の構成からなる。

(1) アミノ酸配列情報を元にブロッキング能を有する新規なブロッキング用タンパク質または部分配列タンパク質候補をスクリーニングする方法であって、以下の条件を満たすタンパク質もしくは部分配列タンパク質をスクリーニングする方法

- 5 A. タンパク質のアミノ酸配列を2分し、それぞれの親水性アミノ酸 (D, E, K, H, R, Y) と疎水性アミノ酸 (G, A, V, L, I, M, F, W, P) の含有率から以下の式を用いて算出された2分された各部分での親水/疎水率の差の絶対値が0.1以上である

$$\cdot (\text{親水/疎水率}) = (\text{親水性アミノ酸含有率}) / (\text{疎水性アミノ酸含有率})$$

- 10 B. 親水性部分 (親水/疎水率の高い方の値) が0.5以上

C. 100残基より多くのアミノ酸よりなる

(2) (1) の方法によってスクリーニングされたブロッキング能を有する新規なブロッキング用タンパク質または部分配列タンパク質であって、以下Dの解析工程により得ることができる、以下のEの条件を満たすタンパク質または部分配列タンパク質

- 15 D 1. ポリスチレン製イムノタイタープレートのそれぞれのウェルに請求項1の条件を満たす候補タンパク質 (0.5~1mg/ml : 20mM Tris-HCl (pH7.0) に希釈) および同様に調製したウシ血清アルブミン (Fraction V) を添加し、2℃~10℃で4~5時間ブロッキングし、液を廃棄する工程 ;
2. PBS (-) で25~100倍希釈した正常ヒト血清を添加し、37℃にて1
- 20 時間放置した後に、プレートをPBS (-) (0.05% Tween 20) にて洗浄する工程 ;

3. 酵素標識した抗ヒトIgG抗体を用いて非特異的にプレートに吸着したIgG量を発色法を用いた比色法にて比較する工程 ;

E 候補タンパク質での発色がウシ血清アルブミンの発色の2.5倍以下である。

- 25 (3) (1) の方法によってスクリーニングされたブロッキング能を有する新規なブロッキング用タンパク質または部分配列タンパク質であって、以下Fの解析工程により得ることができる、以下のGの条件を満たすタンパク質または部分配列タンパク質 :

D 1. 西洋ワサビ由来の標識用ペルオキシダーゼを候補タンパク質溶液 (0.5~

1 mg/ml : PBS (－) に希釈) および同様に調製したウシ血清アルブミン (Fraction V) に 0.05 mg/ml になるよう溶解する工程 ;

2. 上記希釈液をポリスチレン製 96 穴マイクロプレートに分注する工程 ;

3. 1 時間、25℃で放置した後に、溶液を除去し、0.02% Tween 20 を含む PBS (－) で洗浄する工程 ;

4. テトラメチルベンチジン溶液を添加し、37℃でインキュベートした後、1 N の硫酸を添加し反応停止並びに発色させる工程 ;

5. 発色をマイクロプレートリーダーにて測定する工程 ;

G 候補タンパク質での測定値が、ウシ血清アルブミンの発色の 2.5 倍以下である。

10 (4)(1) の方法によってスクリーニングされたブロッキング能を有する新規なブロッキング用タンパク質または部分配列タンパク質であって、以下 H の解析工程により得ることができる、以下の I の条件を満たすタンパク質または部分配列タンパク質 :

H 1. ポリスチレン製イムノタイタープレートのそれぞれのウェルに請求項 1 の条件を満たす候補タンパク質 (0.5~1 mg/ml : PBS (－) に希釈) および同様に調製したウシ血清アルブミン (Fraction V) を添加し、2℃~10℃
15 で 4~5 時間ブロッキングし、液を廃棄する工程 ;

2. 0.05 mg/ml に調製したペルオキシダーゼ溶液を添加し、37℃にて 1 時間放置した後に、プレートを PBS (－) (0.05% Tween 20) にて
20 洗浄する工程 ;

3. 1 時間、25℃で放置した後に、溶液を除去し、0.02% Tween 20 を含む PBS (－) で洗浄する工程 ;

4. テトラメチルベンチジン溶液を添加し、37℃でインキュベートした後、1 N の硫酸を添加し反応停止並びに発色させる工程 ;

25 5. 発色をマイクロプレートリーダーにて測定する工程 ;

I 候補タンパク質での測定値が、ウシ血清アルブミンの発色の 2.5 倍以下である。

(5)(1) に記載の条件 A, B, C を満たすタンパク質または部分配列タンパク質のアミノ酸配列の改変によりブロッキング効率を向上させた新規なタンパク質

(6) アミノ酸配列改変がアミノ酸置換、除去、挿入によるものであることを特徴と

する(5)に記載のブロッキング効率の向上したタンパク質。

(7) 原核生物もしくは真核生物由来であることを特徴とする(5)に記載のブロッキング効率の向上したタンパク質。

(8) 「HSP70ファミリータンパク質」由来であることを特徴とするブロッキング
5 グ効率の向上したタンパク質。

(9) DnaKタンパク質由来であることを特徴とする(8)に記載のブロッキング効率の向上したタンパク質。

(10) DnaKタンパク質の一部のアミノ酸配列を除去したタンパク質であることを特徴とする(8)に記載のブロッキング効率の向上したタンパク質。

10 (11) DnaKタンパク質の一部のアミノ酸配列を除去したタンパク質であって、少なくともN末端から387番目まで、多くとも472番目までのアミノ酸配列を除去したことを特徴とする(8)に記載のブロッキング効率の向上したタンパク質。

(12) DnaKタンパク質の一部のアミノ酸配列を除去したタンパク質であって、少なくともN末端から387番目まで、多くとも418番目までのアミノ酸配列を除去したことを特徴とする(8)に記載のブロッキング効率の向上したタンパク質。
15

(13) DnaKタンパク質の419～607番目までのアミノ酸配列からなる(8)に記載のタンパク質

(14) ATPaseドメインもしくはその一部を除去したDnaKタンパク質の一部の親水性アミノ酸を疎水性アミノ酸に置換したことを特徴とする(8)に記載のブロッキング効率の向上したタンパク質。
20

(15) ATPaseドメインもしくはその一部を除去したDnaKタンパク質の一部のアミノ酸配列を除去したタンパク質であって、アミノ酸番号479と481のアスパラギン酸をバリンに置換した(8)に記載のブロッキング効率の向上したタンパク質。

25 (16) DnaKタンパク質の384～607番目のアミノ酸配列からなり、アミノ酸番号479と481のアスパラギン酸をバリンに置換した(8)に記載のブロッキング効率の向上したタンパク質。

(17) 1以上の親水性ドメインと1以上の疎水性ドメインを有するブロッキング用タンパク質であって、疎水性ドメインが器壁に吸着可能であり、親水性ドメインが器

壁に吸着した疎水性ドメインを覆うことが可能であるブロッキング用タンパク質。

(18)ブロッキング速度がBSAよりも向上していることを特徴とする改変されたタンパク質。

(19)3時間のブロッキングにおいてBSAと同等のブロッキング効率を示すよう
5 にタンパク質量を揃えた条件において、10分未満のブロッキング能がBSAよりも優れることを特徴とする(18)に記載の改変されたタンパク質。

(20)タグ配列を有することを特徴とする(2)～(19)のいずれかに記載のタンパク質

(21)タグ配列がヒスチジンタグ、マルトースバインディングプロテイン(MBP)
10 タグ、グルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)タグ、Flagタグ、Mycタグ、タンデムアフィニティーピュリフィケーションタグから選択されることを特徴とする(20)に記載のタンパク質

(22)原核生物を用いて(2)～(21)のいずれかに記載のタンパク質を生産することを特徴とするタンパク質の生産方法

15 (23)大腸菌を用いて(2)～(21)のいずれかに記載のタンパク質を生産することを特徴とするタンパク質の生産方法

(24)無細胞タンパク質合成法を用いて(2)～(21)のいずれかに記載のタンパク質を生産することを特徴とするタンパク質の生産方法

(25)加熱工程を経ることを特徴とする(2)～(21)のいずれかに記載のタン
20 パク質の精製方法

(26)(2)～(21)のいずれかに記載のタンパク質をブロッキング、安定化、賦形、フォールディング補助、リフォールディング補助、コーティング、医療用に使用する方法

(27)(2)～(21)のいずれかに記載のタンパク質を含有するブロッキング試
25 薬、安定化剤、賦形剤、フォールディング補助剤、リフォールディング補助剤、コーティング剤または医療用コーティング剤。

発明を実施するための最良の形態

ここでいうブロッキングとは、容器や担体などへの成分の非特異的吸着を妨げるこ

とを言い、特にプラスチックなどの樹脂へのタンパク質の非特異的吸着を妨げること
をいう。様々な測定において、測定対照の成分が非特異的に器壁に吸着することによ
り、バックグラウンドとして測定を妨げることが問題となる。特に免疫学的測定にお
いて、抗体のポリスチレンプレートへの吸着は顕著であり、通常、あらかじめ樹脂等
5 に吸着しやすいタンパク質を添加して、抗体の非特異的吸着を妨げる操作、すなわち
ブロッキングを行うことが広く行われている。免疫的測定には、タンパク質を器壁に
物理的に吸着させることが必須であることから、ポリスチレン等の樹脂で出来たタン
パク質の吸着しやすいプレートが広く使われるが、余分な成分の吸着も顕著であるた
め、より良いブロッキング剤が常に求められているのが現状である。また、臨床用診
10 断薬においても、診断薬用酵素の自動分析機のセルへの非特異吸着が問題となってい
るものも多い。

本発明では主に、免疫学的測定を念頭に置き、最も非特異吸着が顕著である例とし
て知られているヒト血清中の I g G のポリスチレンプレートへの非特異吸着を測定
することで、ブロッキング効果を測定した。すなわち、測定は以下の工程よりなる。

15 (1) ポリスチレン製 96 穴プレートにブロッキング能を調べたいタンパク質溶液を
加え、一定時間静置し、プレートをブロッキングする。

(2) (1) の液を除去し、希釈したヒト血清を添加し、インキュベートする。

(3) プレートを洗浄した後、標識抗ヒト I g G 抗体を添加し、インキュベートする。

(4) プレートを洗浄した後、比色法により非特異的に結合した I g G 量を比較する。

20 詳細な方法については以下で述べるが、この方法は本発明を遂行するにあたり非常に
有効であった。本方法の概略を図 1 に示す。

ブロッキング試薬としては、従来ウシ血清アルブミン (B S A) やウシ乳中のカゼ
インなどが広く使われて来た。しかし、それらの高いブロッキング能がタンパク質の
どの性質から来るのか、理論立てた説明は未だなされておらず、一般にはその疎水性
25 に起因していることが通説のようにになっている。

そこで、まず疎水性の高いタンパク質にブロッキング能が備わっているのかを調べ
る目的で疎水性アミノ酸の含量が高いことが知られている *Pseudomonas*
aeruginosa 由来のリパーゼをブロック剤として使用し、そのブロック能を
調べた。リパーゼは臨床検査用途などにも使われているが、測定時のセル吸着などが

問題となることがあるほどプラスチック表面への吸着能が高いことが知られている。しかし、実験の結果、ブロッキングの効果はほとんど見られないことが明らかとなった。それぞれのタンパク質中の親水性アミノ酸と疎水性アミノ酸の比率等を図13に示したが、比較してみるとBSAやカゼインの疎水性はリパーゼの疎水性に較べ低いことが分かる。このことから考察される事項としては、タンパク質がその疎水性で吸着する現象と、ブロッキング能とは関連はあるが、すべてではないということである。リパーゼのブロッキング能が発揮されなかった理由としては、器壁に吸着したリパーゼにタンパク質が非特異的に吸着したことに起因していると推察される。

ここでいう親水性アミノ酸、疎水性アミノ酸は教科書等によっては、様々な定義があるが、本発明においては、親水性アミノ酸として、アスパラギン酸、グルタミン酸、リジン、ヒスチジン、アルギニン、チロシンとした。また、疎水性アミノ酸としては、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファン、プロリンと定義した。

本発明では、親水性アミノ酸として、アスパラギン酸、グルタミン酸、リジン、ヒスチジン、アルギニン、チロシンと定義した。また、疎水性アミノ酸としては、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファン、プロリンと定義したが、親水性アミノ酸でHis, Tyr、特にTyrは親水性が低く、疎水性アミノ酸でGly, Ala、特にGlyは疎水性が低いと考えられ、更に厳密に厳密性を持たせて予測するためには、TyrとGlyを除外して計算し、更に好ましくは、His, Tyr, Gly, Alaを除外して計算すると良い結果が得られることもある。また、後に示すブロッキング能の改変においても、親水性、疎水性の強弱を念頭において改変を行うことが好ましい。

そこで次に、様々な切り口からそれぞれのアミノ酸の含有率を計算したところ、ブロッキング能を示すBSA（シグナルペプチドなし）とウシ由来 α カゼイン（シグナルペプチドなし）のアミノ酸配列の2分された各部分、例えばN末端側とC末端側で、親水性アミノ酸含有率と疎水性アミノ酸含有率の傾向が異なることが明らかとなった（図14）。本発明において、親水性アミノ酸含有率を疎水性アミノ酸含有率で割った値を便宜上「親水／疎水率」と定義するが、BSAのN末端側の親水／疎水率は1.00であるのに対し、C末端側は0.83であり、0.17の差があることがわ

かる。 α カゼインでは、N末端側0.88、C末端側0.64となりその差は0.24であった。一方、ブロッキング能を示さない*Pseudomonas*由来のリパーゼにおいては、N末端側0.39、C末端側が0.44とその差が0.05であり0.1にも満たないことが分かった。このことから、ブロッキング能を示すには、タンパク質分子の中の比較的疎水的な領域に加え、親水的な領域が必要であるということが条件になっていることが推察された。

本発明のタンパク質において、親水性部分、疎水性部分及び全長の親水／疎水率は、以下の範囲が好ましい。

親水性部分の親水／疎水率は0.5～2.0、より好ましくは0.7～1.7、さらに好ましくは0.8～1.5である。

疎水性部分の親水／疎水率は0.2～1.1、より好ましくは0.3～1.0、さらに好ましくは0.4～0.9である。

タンパク質全体の親水／疎水率は0.4～2.0、より好ましくは0.5～1.5、さらに好ましくは0.6～1.0である。

親水性部分と疎水性部分の親水／疎水率の差（絶対値）は好ましくは0.1～0.6、より好ましくは0.15～0.5、さらに好ましくは0.15～0.4である。

親水性部分と疎水性部分は、いずれが2分された各部分、例えばC末端側（或いはN末端側）であってもよい。

また、本発明は、親水性部分と疎水性部分が2分された各部分、例えばC末端側或いはN末端側に存在すると仮定しているが、N末端側又はC末端側に親水性でも疎水性でもない配列を追加したものも、親水性部分と疎水性部分が存在する限り、本発明に含まれる。

さらに本発明は、図2に示すように親水性部分－疎水性部分－親水性部分や、疎水性部分－親水性部分－疎水性部分、さらには親水性部分－疎水性部分－親水性部分－疎水性部分のような順序で各部分を有するものも本発明に含まれる。

上のことを踏まえると、疎水部分（疎水ドメイン）が器壁に吸着し、親水部分（親水ドメイン）がその上にかぶさるような形態をとり、全体でみると親水部分で器壁を覆うようにして、ブロッキングしていることが推察される。そのモデルを図3に示す。リパーゼがブロッキング能を示さなかったのは、吸着されるが、吸着されたタンパク

質が疎水的でありすぎたため、そのタンパク質への更なる非特異的吸着が起きたことが予想される。

器壁に吸着する疎水性部分と、疎水性部分を覆う親水性部分の比率は、疎水性部分 1 に対し親水性部分 0.3～1.0、好ましくは 0.5～5、さらに好ましくは 0.7 5 ～2 である。疎水性部分が大きすぎると親水性部分により覆うことができなくなり、器壁に吸着された疎水性部分に、さらに他のタンパク質が吸着することになる。また、親水性部分が大きすぎると、疎水性部分が器壁に吸着する面積が小さくなりすぎ、十分強固に吸着できなくなったり、ブロッキングの効率が低下したりする。

なお、本発明において、「2 分する」とは、全配列を約 50% ずつ分けることを意味 10 するのではなく、疎水性部分と親水性部分の 2 つに分けるというだけの意味である。親水性部分と疎水性部分の一方又は両方が複数存在する場合、複数存在する親水性部分／疎水性部分の親水／疎水率は、平均値として計算される。また、親水性部分、疎水性部分は、各々ひとかたまりの部分、好ましくはドメイン構造を有するものであり、各部分は、全体配列の 20% 以上、好ましくは 30% 以上、より好ましくは 40% 以上 15 である。ただ、タンパク質の構造が分かっていなかったり、予測困難な場合には、アミノ酸配列を N 末端側と C 末端側に大きく 2 分して解析するが好ましく、効果的である。

図 14 を見る限りでは、親水／疎水率の親水ドメインと疎水ドメイン間の差はタンパク質間では若干ばらつきがあり、その値の大きさのみがブロッキング能力を詳細ま 20 で反映していない可能性もあると思われる。そのファクターの一つは分子量であると思われる。本発明において、「100 残基より多くのアミノ酸よりなる」とは、アミノ酸配列全体のアミノ酸合計数が 100 残基以上であることを意味し、好ましくは 150 残基より多くのアミノ酸よりなり、より好ましくは 200 残基より多くのアミノ酸よりなる。また、上限は 2000 アミノ酸残基であることが好ましく、より好ましい 25 上限は 1500 アミノ酸残基、さらに好ましい上限は 1000 アミノ酸残基である。親水性の部分またはドメインのアミノ酸数は、好ましくは 30 アミノ酸残基以上、より好ましくは 50 アミノ酸残基以上、さらに好ましくは 60 アミノ酸残基以上、特に好ましくは 80 アミノ酸残基以上であり、また、好ましくは 1000 アミノ酸残基以下、より好ましくは 500 アミノ酸残基以下である。

疎水性の部分またはドメインのアミノ酸数は、好ましくは30アミノ酸残基以上、より好ましくは50アミノ酸残基以上、さらに好ましくは60アミノ酸残基以上、特に好ましくは80アミノ酸残基以上であり、また、好ましくは1000アミノ酸残基以下、より好ましくは500アミノ酸残基以下である。

- 5 ここでいうドメインとは、分子の構造上あるいは機能上一つのまとまりをもつ領域のことをいうわけであるが、本発明においては主に、構造上のまとまりのある単位のことをいう。

次に我々は、この仮定が正しいか否か、単純なタンパク質を用いて証明することとした。この実験には、大腸菌のヒートショックタンパク質の一種であるHSP70 (DnaK) の基質結合ドメインを用いた。このタンパク質 (DnaK384-607) は、既にNMR解析で構造が明らかとなっており (図4)、2つの構造的な領域 (ドメイン)、すなわちN末端側の β シート領域 (ドメイン) とC末端側の α ヘリックス領域 (ドメイン) からなっていることが分かっている。また、配列のN末端側の親水/疎水率が0.5であり、C末端側では0.89で、その差は0.39と高い値を示すことが計算によって明らかにされた。

そこでまず、このタンパク質 (DnaK384-607) がブロッキング能を示すかを確認したところ、BSA程ではないがブロッキング能があることが確認され (図5)、本発明の方法の有効性が示された。

そこで次に、DnaK384-607の種々のデリーションミュータントを作製し、DnaKのどの構造がブロッキングに対して重要な役割を果たしているかを調べた。今回検討した変異体を図6に示した。検討したタンパク質は、DnaK 384-638、DnaK 384-607、DnaK 384-578、DnaK 384-561、DnaK 508-607、DnaK 525-607の5種類である。これらのタンパク質は大腸菌を宿主として大量発現が可能であり、それぞれのタンパク質のN末端側にヒスチジンタグを付加して発現させ、ニッケルキレートカラムを用いて簡便に精製し、実験に用いることができる。今回の実験はヒスチジンタグを付加したタンパク質を用いて検討を行っているが、タグが小さいためその影響は無視した。当然、タグ配列がない場合にも同等の効果が得られることは確認してある (実施例7)。

実験の結果、 α ヘリックス構造の一部を削ったDnaK 384-578、Dna

K 384-561と β シート部分を除去し α ヘリックス構造のみからなると思われるDnaK 508-607、DnaK 525-607のブロッキング効率は有意に低下することが分かった(図5)。DnaK 384-561に関しては、既にそれに近いDnaK 381-553のNMRによる立体構造が明らかとなっており

- 5 (図7)、それから類推すると、 α ヘリックス構造が壊れていることが予想される。これらのことから以下のことが示唆される。すなわち、(1)ブロッキング能を有するタンパク質の親水性部分の縮小や構造破壊によってブロッキング能は損なわれる。(2)親水性部分だけではブロッキング能を示さない。これは、ブロッキング能を発揮するには、疎水性部分に加えて親水性部分が重要であり、ブロッキング能を示すタンパク質は図3に示すように疎水部分でプレートに吸着し、親水性部分でプレート表面を覆う結果ブロッキング効果を発揮していると考えられるからであると思われ
- 10 10 DnaKにおいては正に図3の左図のようにになっているものと予想される。

一般的に、変性やミューテーションなどにより2次構造が崩壊することで、タンパク質の親水性が失われることが知られており、上のDnaKの例からも親水ドメインを破壊するようにして、部分配列タンパク質を調製することは適切でないことが予想

15 15 される。それとは逆に図8のように疎水ドメインを破壊することにより、疎水性を向上させることは可能であると思われる。

また、本発明において、ドメインが重要であり、少なくとも1つより多くのドメイン構造が必要であると思われる。そこで、一つの構造ドメインを構成するのに必要と

20 20 される100アミノ酸が目安となる。よって、本発明は少なくとも100残基より多くのアミノ酸からなる、すなわち一つより多くのドメイン構造を有することが望ましいといえる。

そのような事実を踏まえ、本発明は、アミノ酸配列情報を元にブロッキング能を有する新規ブロッキング用タンパク質または部分配列タンパク質をスクリーニングする方法を提供する。詳しくは、以下に示す条件を満たすタンパク質もしくは部分配列タンパク質をスクリーニングする方法である。

25 25

A. タンパク質のアミノ酸配列を2分し、それぞれの親水性アミノ酸(D, E, K, H, R, Y)と疎水性アミノ酸(G, A, V, L, I, M, F, W, P)の含有率から以下の式を用いて算出された2分された各部分での親水/疎水率の差の絶対値が

0. 1 以上である

・ (親水/疎水率) = (親水性アミノ酸含有率) / (疎水性アミノ酸含有率)

B. 親水性部分 (親水/疎水率の高い方の値) が 0. 5 以上

C. 100 残基より多くのアミノ酸よりなる

- 5 上記条件中、Dはアスパラギン酸、Eはグルタミン酸、Kはリジン、Hはヒスチジン、Rはアルギニン、Yはチロシン、Gはグリシン、Aはアラニン、Vはバリン、Lはロイシン、Iはイソロイシン、Mはメチオニン、Fはフェニルアラニン、Wはトリプトファン、Pはプロリンを示す。教科書等によっては、親水性アミノ酸、疎水性アミノ酸には様々な定義があるが、本発明においては、親水性アミノ酸として、アスパラギン酸、グルタミン酸、リジン、ヒスチジン、アルギニン、チロシンとした。また、
- 10 疎水性アミノ酸としては、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファン、プロリンとした。

本発明でいう部分配列タンパク質とは、野生型タンパク質の一部分のアミノ酸配列

15 からなるタンパク質を示し、好ましくは一つより多くのドメイン構造を有するタンパク質である。

アミノ酸配列を例えばN末端側とC末端側に2分する場合、必ずしも正確に2分する必要はないがなるべく双方のアミノ酸の数がほぼ均等になるように分割する方が好ましい。また、アミノ酸配列からシグナルペプチドが予想される場合は、その部分

20 は除いて計算すると良い。実際、本発明においても、BSA、 α カゼイン、リパーゼとともにシグナルペプチドを除去した成熟型のアミノ酸配列を用いて計算を行った。

また、図2に示したようなN末端側、C末端側へ二分する以外の分割方法も好ましく用いられる。このような場合、立体構造が明らかになっているタンパク質や立体構造が予測されるタンパク質の方が好ましく応用されうる。

- 25 アミノ酸一次配列から、各種アミノ酸含量を算出するには遺伝子・アミノ酸配列解析ソフトを用いることが効果的である。解析ソフトとしては特に限定されないが、本発明においては、GENETYX (ソフトウェア開発株式会社) を用いて行った。

また、ソフトウェアの疎水性計算機能を用いてタンパク質の疎水性、親水性をグラフ化することも、スクリーニング作業を効率的に進めるためには効果的である。好ま

しくは、hopp & woods の計算式が用いられる。

また本発明は、上記方法によりアミノ酸配列からスクリーニングされたブロッキング能を有するタンパク質または部分配列タンパク質であって、以下のDの解析工程により、Eの条件を満たすタンパク質または部分配列タンパク質である。

- 5 D 1. ポリスチレン製イムノタイタープレートのそれぞれのウェルに請求項1の条件を満たす候補タンパク質 (50~100mg/ml : 20mM Tris-HCl (pH7.0) に希釈) および同様に調製したウシ血清アルブミン (Fraction V) を添加し、2℃~10℃で4~5時間ブロッキングし、液を廃棄する工程
2. PBS (-) で25~50倍希釈した正常ヒト血清を添加し、37℃にて1時
10 間放置した後に、プレートを0.05% Tween 20 / PBS (-) にて洗浄する工程
3. 酵素標識した抗ヒトIgG抗体を用いて非特異的にプレートに吸着したIgG量を発色法を用いた比色法にて比較する工程
- E. 候補タンパク質での発色がウシ血清アルブミンの発色の2.5倍以下、好ましくは2倍以下、より好ましくは1.5倍以下、さらに好ましくは1.2倍以下、特に
15 1倍以下である。

ここでは、プラスチックプレートへの非特異吸着が顕著であることが知られている、ヒト血清中のIgGの非特異的吸着を目安として、ブロッキング能を測定する。ここでいうポリスチレンイムノタイタープレート (96ウェルタイプ) とは一般的に免疫
20 測定で使用するポリスチレン製の96ウェルタイプのイムノタイタープレートを使用する。候補タンパク質は適切な方法で精製したものをいい、最終的に20mM Tris-HCl (pH7.0) で50~100mg/ml となるように希釈しておく。同時にウシ血清アルブミン (BSA) も同様に調製しておく。BSAはSIGMA社等から市販されているFraction Vを用いることができる。また同じ性能である
25 ののであれば、特にFraction Vでなくても良い。ブロッキングは2~8℃で4~5時間行った後、液を完全に除去し、洗浄なしで次のステップへ進む。

ここで使用されるヒト血清は正常成人から分離した血清であれば特に限定されず、原液は高濃度であるのでPBS (-) で25~50倍に希釈して使用するのが良い。血清中のIgGの量は個体差があるので、希釈率を多少変更してもかまわない。プレ

ートへの非特異吸着は37℃、30分間行う。また、この時添加する血清の量は正確に測定するために、最初にブロッキングした液量よりも少ない量にすることが好ましい。例えば、ブロッキングを100 μ lで行った場合は、50 μ lの希釈血清溶液を添加する。最後に、正確に1時間反応を行った後、液を除き、十分量の0.05% Tween 20 / PBS (-) にて洗浄を行う。洗浄は、3回以上が好ましく、更に好ましくは4回行う。洗浄は、専用のプレート洗浄機を用いても良い。

次に、酵素標識した抗ヒトIgG抗体を適切な溶液で適切な濃度までに希釈し、上記ウェルに添加する。反応時間は37℃、1時間が適切である。抗体の希釈は、通常免疫学的検出に用いる程度が好ましく、また、抗体の希釈には適切なブロッキング剤 (BSAやカゼイン) が含有されていた方がばらつきが無く良く、更に好ましくは、0.01M リン酸バッファー (pH7.4)、0.15M NaCl、0.5% カゼインを用いると良い。標識に用いる酵素としては、ペルオキシダーゼとアルカリホスファターゼが好ましく用いられ、特にペルオキシダーゼが好ましく用いられる。ペルオキシダーゼ用の発色試薬としては、テトラメチルベンジジン (TMBZ: 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidine) が好ましく用いられる。また、アルカリホスファターゼの発色基質としては、WT-1を用いることが出来る。発色時間は、目的となるウェルの吸光度が定量性を失わない程度 (0.5~1.5) に来るようにするのが望ましい。定量域を越えた場合は、正しい値は得られないので、注意する。また、全操作を通じてなるべくプレートを乾燥させないようにしなければ正確な値は得られない。

このようにして得られた値は、低いほどブロッキング効率が高いことを示しており、本発明においては、BSAの値の2.5倍以下の値を示した場合、ブロッキング能を有したと判定した。よって、本発明のブロッキング能を有する新規なブロッキング用タンパク質または部分配列タンパク質は請求項1に示した条件を満たし、かつ、本アッセイでBSAの値の2.5倍以下の値を示す、すなわちブロッキング能を有するタンパク質である。

また、このアッセイの代替法として、実施例7に示したような方法を用いることも可能である。すなわち、候補タンパク質溶液に段階希釈したペルオキシダーゼを溶解した後、固相へ供し、一定時間吸着させ、ペルオキシダーゼの非特異的吸着を測定す

る。吸着したペルオキシダーゼの確認法は、上記の方法と同様、テトラメチルベンジジン (TMBZ: 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidine) の発色法が好ましく用いられる。本アッセイにおいても、BSAの値の2.5倍以下の値を示すことがブロッキング能を示す指標となる。また、同様に、あらかじめ
5 ブロッキングした固相に、希釈ペルオキシダーゼ溶液を添加して、その非特異吸着を測定しても良い。その場合も、BSAの値の2.5倍以下の値を示すことがブロッキング能を示す指標となる。ここで用いるペルオキシダーゼ溶液の濃度は、0.05 mg/ml が好ましく用いられるが、常識的な範囲で測定できるように、調整して使用するとより正確な評価に繋がる。ペルオキシダーゼの希釈は、PBS (-) で行うこと
10 が好ましいが、特に限定されない。

このことから、本発明は一つより多くのドメイン構造を有することが好ましいといえるが、この例のように特に疎水側ドメインについては二つのドメインのうち一つのドメイン構造の一部を欠いても良い。本発明のタンパク質又は部分配列タンパク質のアミノ酸の数としては100以上、好ましくは150以上、さらに好ましくは、18
15 0以上が好ましい。

さらに、本発明は、上記請求項1の条件に合うタンパク質のアミノ酸配列を改変することにより、タンパク質もしくはその部分配列タンパク質のブロッキング効率を更に向上させた新規なタンパク質である。ここでいう新規とは、アミノ酸改変のレベルで新規ということであり、既に知られているタンパク質であっても良い。また、部分
20 配列の場合、今まで知られていない部分配列を有するものも新規とみなされる。

本発明において、アミノ酸配列の改変は、アミノ酸置換、除去 (デリーション)、挿入 (インサージョン) のいずれか、もしくは、重複して行っても良い。変異の方向性としては、疎水領域の疎水性をさらに向上させるような変異や親水性領域の親水性をさらに向上させるような変異が効果的であり、好適に使用される。また、タンパク
25 質の立体構造を変化させるために、アミノ酸配列の除去や挿入なども効果的であり、親水的な領域に埋もれた疎水領域をタンパク質表面に露出されることなどの方法が考えられる。一方、上記の例で示したように、親水ドメインの構造を壊す方のアミノ酸改変は好ましくないと言える。

改変されるタンパク質は原核生物もしくは真核生物由来のものでも良く、大腸菌な

どを用いて大量調製することを考えると、原核生物由来のタンパク質が好ましく用いられる。更に好ましくは、大腸菌由来のタンパク質が用いられる。用いられるタンパク質はドメインなどの一部分の構造体でも良く、むしろ好適に使用される。

特に、ブロッキング剤は時に酵素等と混合して安定化剤や賦形剤として用いられることが多く、酵素活性の特別な機能を有さないタンパク質が本発明には適しているといえる。また、酵素活性を有するドメインを除去したタンパク質なども好ましく用いられる。

本発明では、HSP70ファミリータンパク質由来のタンパク質が好ましく用いられ、更に好ましくは大腸菌のDnaKタンパク質由来のタンパク質が用いられる。また、好ましくは、ATPaseドメインを除去したHSP70ファミリータンパク質の基質結合ドメインが好ましく用いられ、更に好ましくは大腸菌のATPaseドメインを除去したDnaKタンパク質の基質結合ドメインが用いられる。DnaKタンパク質の基質結合ドメインに関しては、既に実施例として上で紹介したものである。

本発明に用いるHSP70ファミリーに属するタンパク質としては、特に指定はないが、大腸菌のDnaK、酵母細胞質に存在する Ssa1p、酵母ミトコンドリアに存在する Ssc1p、酵母小胞体に存在するKar2p、哺乳類細胞質に存在するHSP70、哺乳類小胞体に存在する Bip、哺乳類ミトコンドリアに存在するmHsp70 および熱ショックの有無に関わらず恒常的に発現しているHSP70のホモログであるHSC70などから選択される。HSP70ファミリーには数多くのホモログが知られており、上に挙げたものはそのうちの一部である。当然、上に
20 列挙した以外のホモログにも同様の効果が期待できることは容易に予想可能である。

特に、大腸菌のDnaKは良く研究が進んでいることから、アミノ酸改変などの効果予測が比較的容易であるといえる。このタンパク質は638アミノ酸から構成され、1～385番目のアミノ酸より構成される「ATPase (ATP結合) ドメイン」
25 と386～638番目のアミノ酸より構成される「基質結合ドメイン」からなっている(図6)。配列番号1にDnaKのタンパク質の配列を、また配列番号2に遺伝子配列を示す。HSP70は新生ポリペプチドや部分的にフォールドしたタンパク質に結合し、自発的にフォールディング出来ないタンパク質のリフォールディングを助けることが知られており、また、タンパク質合成の比較的初期に働くためより豊富な基

質を認識することが知られている。

また、DnaKの基質結合ドメイン自体に、変性したタンパク質のリフォールディングを促す作用があることも知られており（Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2002) 99, 15398-15403）、この分子を
5 用いることにより、様々な用途展開が可能になると考えられる。

今回の本発明を達成するにあたり、我々はこのDnaKの基質結合ドメインに着目し、様々な検討によって、ブロッキング作用発現のメカニズムに関する様々な知見を得ることが出来、本発明に至ることが出来た。

まず我々は、 β シート構造部分に変異を加えることで β シート部分の疎水性を向上
10 させ、ブロッキング効率に優れたタンパク質を作り出す試みを行った。その試みは
(1) β シートのN末端の一部を除去することで、 β シートのより疎水的な部分を露出させる（ β シート構造を破壊して疎水性を向上させる）、(2) β シート上の親水性アミノ酸を疎水性アミノ酸に置換する、というものである。その結果、 β シート構造のN末端部分を除去したDnaK 419-607と、 β シート上の親水性アミノ酸
15 を疎水性アミノ酸に置換したDnaK 384-607 (D479V, D481V) にブロッキング効率の顕著な向上を認めることができた（図9）。今回特に、DnaK 419-607に顕著なブロッキング効率の向上を認めることが出来た。このタンパク質は、図8で示したような形でブロッキングを示していると思われる。すなわち、疎水性ドメインの構造が変化したことで、疎水性ドメインの構造が変化し、疎水性ドメインの疎水性が向上したことが、ブロッキング能の向上につながったと考えら
20 れる。

本発明でいう、ブロッキング能の向上とは、候補タンパク質にアミノ酸置換、デリーション、挿入などを行い、もととなったタンパク質またはタンパク質部分配列よりもブロッキング能が向上したことを示す。

25 このブロッキング能の向上は、好ましくは請求項2に示した方法で測定されるのが好ましい。また、ブロッキング能の向上には、長時間のブロッキング能と短時間でのブロッキング能があるが、どちらかもしくは両方においてブロッキング能が向上していれば良い。

DnaK 419-607での効果が顕著であった理由を更に詳しく考察すると、

DnaK基質結合ドメインのコの字型の構造のヒンジ部分に隣接する β シート部分を除去したことによりシャペロンの基質としてのペプチドをトラップするための疎水性に富んだコの字構造の内側の一部分が外側へ露出したことに起因していることが推察される。

- 5 すなわち、本発明は少なくともN末端から387番目まで、多くとも472番目までのアミノ酸配列を除去したことを特徴とするブロッキング効率の向上したDnaKタンパク質である。また、本発明は少なくともN末端から387番目まで、多くとも418番目までのアミノ酸配列を除去したことを特徴とするブロッキング効率の向上したDnaKタンパク質である。さらに好ましくは、DnaKタンパク質の419～607番目までのアミノ酸配列からなるタンパク質である。

- また、本発明は、ATPaseドメインもしくはその一部を除去したDnaKタンパク質の一部の親水性アミノ酸を疎水性アミノ酸に置換したことを特徴とするブロッキング効率の向上したタンパク質である。更に詳しくは、ATPaseドメインもしくはその一部を除去したDnaKタンパク質の一部のアミノ酸配列を除去したタンパク質であって、アミノ酸番号479と481のアスパラギン酸をバリンに置換したブロッキング効率の向上したタンパク質である。また更に好ましくは、DnaKタンパク質の384～607番目のアミノ酸配列からなり、アミノ酸番号479と481のアスパラギン酸をバリンに置換したタンパク質が使用される。

- 本発明でいう改変されたとは、候補タンパク質のアミノ酸置換、デリーション、挿入などにより、アミノ酸配列が改変されたことを指す。この改変は、候補タンパク質もしくはタンパク質の部分配列を選び出した後、上に示したような考察により、(1)親水ドメインを破壊しないようにする、(2)疎水ドメインを更に疎水性にする、などを意図してアミノ酸を改変することが好ましい。また、本発明では示さなかったが、親水性ドメインを更に親水性にするような方策を当然考えるべきである。

- 25 また、本発明においてはブロッキングの速度に関する検討も実施し、本発明の有用性を示した。すなわち、5分、10分、30分、3時間ブロッキングした時の、ブロッキング効率を測定した。その結果、今回効果が最も顕著であったDnaK419-607は、約5分間のブロッキングでDnaK384-638が58.8%のブロッキング効率であるのに対し、87.5%の効率でブロッキングが行われていることが

判明した。この速度は、3時間後で同等の効果を示すB S Aと比べても速く、非常に早い段階でポリスチレンプレートに吸着してブロッキング効果を発揮すると予想される。よって、本発明を用いることで、従来のB S Aと同等もしくはそれ以上の性能を有する、新規なブロッキング剤を開発できる可能性が考えられる。

- 5 また本発明は、1以上の親水性ドメインと1以上の疎水性ドメインを有するブロッキング用タンパク質であって、疎水性ドメインが器壁に吸着可能であり、親水性ドメインが器壁に吸着した疎水性ドメインを覆うことが可能であるブロッキング用タンパク質である。ここでいうドメインとは好ましくは50アミノ酸以上からなる構造的なアミノ酸のまとまりであり、一部を欠損、付加などされたものについてもドメイン
- 10 とみなす。

- また、本発明は、ブロッキング速度についても規定する。すなわち、ブロッキング速度がB S Aよりも向上していることを特徴とする改変されたタンパク質である。また詳しくは、3時間のブロッキングにおいてB S Aと同等のブロッキング効率を示すようにタンパク質量を揃えた条件において、10分未満のブロッキング能がB S Aよりも優れることを特徴とする改変されたタンパク質である。ここで改変されたとは、野生型のタンパク質をコードする遺伝子配列が、アミノ酸置換、デリーション、挿入などによって変換されたということを示している。評価方法としては、特に限定されないが、実施例5および実施例7に示した方法が好ましく用いられ、I g Gやペルオキシダーゼのポリスチレンプレートへの非特異的な吸着を指標に測定される。I g G
- 15 を用いる評価方法としては、1～10分間、好ましくは2～10分間ブロッキングを行った後、P B S (－) で希釈したヒト血清を添加し、37℃・60分間インキュベートした後、洗浄を行い、至適濃度の抗ヒトI g G抗体（ペルオキシダーゼ結合）を反応させ、洗浄後、T M B Z の発色により非特異吸着したI g G量を測定する。また、ペルオキシダーゼを用いる評価法としては、まず西洋ワサビ由来の標識用ペルオキシ
- 20 ダーゼ（東洋紡績(株)製P E O－131）をブロッキング能を測定したいタンパク質溶液に2mg/mlになるよう溶解する。次いで、同溶液によりペルオキシダーゼ溶解液の40～320倍まで希釈系列を作成し、それぞれの希釈液100μlをポリスチレン製96穴マイクロプレートに分注する。室温で1時間放置した後に溶液を除去し、0.02% T w e e n 20を含むP B S緩衝液で洗浄する。この洗浄操作を6回繰
- 25

- り返した後、良く洗浄液を取り除く。テトラメチルベンチジンを添加し、37℃で正確に10分間インキュベートした後、1Nの硫酸を添加し反応停止並びに発色させる。この発色はマイクロプレートリーダーにて主波長450nm、副波長650nmにて測定する。詳しくは、実施例7に記載する。また、同様に、あらかじめブロッキング
- 5 した固相に、希釈ペルオキシダーゼ溶液を添加して、その非特異吸着を測定しても良い。ここで用いるペルオキシダーゼ溶液の濃度は、0.05mg/mlが好ましく用いられるが、常識的な範囲で測定できるように、調整して使用するとより正確な評価に繋がる。ペルオキシダーゼの希釈は、PBS(−)で行うことが好ましいが、特に限定されない。
- 10 また、この実施例においては、0.7mg/mlのDnaK419-607と3時間後に同等のブロッキング能を示すBSAとして2.4mg/mlのBSA(Fraction V;シグマ社製(Code: A-4503))を用いた(タンパク質量はブラッドフォード法にて測定)。検体タンパク質の量はブロッキング能を測定する常識的な範囲で用いられればそれで良いが、好ましくは0.5~1mgの範囲で用い
- 15 られることが好ましい。また、本測定に用いるBSAの濃度は、検体タンパク質の3時間目のブロッキング効率と同等のブロッキング効率を示す量を用いるが、これはあらかじめ濃度の検討が必要である。それらのタンパク質を溶解するバッファーとしては、20mM Tris-HCl(pH7.0)やPBS(−)が好ましく用いられるが、特に限定されない。
- 20 本発明に用いるタンパク質もしくはタンパク質フラグメントはタグを有していても良く、実際、検討にはアミノ末端にヒスチジンタグを付加したものをを用いて検討を行った。タグとしては、ヒスチジンタグ、GST(グルタチオン-S-トランスフェラーゼ)タグ、MBP(マルトースバインディングプロテイン)タグ、Flagタグ、Mycタグ、TAP(タンデムアフィニティーピュリフィケーション)タグなど、ど
- 25 のタグを採用しても良く、必要に応じて任意のタンパク質を融合して用いても良い。また、既知のタグに任意のアミノ酸配列などを付加しても良い。

さらに当然ではあるが、一般的に知られていないタグや、任意のアミノ酸配列を付加しても良い。具体的には、N末端側を削ったタンパク質の部分配列を用いるときは、当然、N末端にメチオニン残基を導入する必要がある。また、発現向上や制限酵素サ

イトの関係から数アミノ酸の付加なども考えられる。例えば実施例7のDnaK419-607NのN末端には、MRGSの4アミノ酸が付加されている。また、当然任意のタンパク質との融合タンパク質として発現させても良い。付加する位置は、N末端側、C末端側を問わない。

- 5 本タンパク質の発現方法は特に限定されないが、原核生物を用いて発現させる方法が好ましく、さらには、大腸菌を用いて発現させる方法がさらに好ましい。また、発現ベクターに関しても特に限定されず、一般的に発現に使用されるものであればよい。

本発明のタンパク質の精製方法は、上記タグを用いた精製方法以外に、粗精製溶液を適当な温度で加熱して、その遠心上清を精製すると効率よく精製できる場合がある。

- 10 加熱は好ましくは50℃以上、更に好ましくは70℃以上で行われる。今回用いたDnaKの基質結合ドメインも熱への耐性があり、70℃、30分間という条件では、凝集が認められず、遠心上清画分にタンパク質が残ることを確認している。よって、精製する場合は、この加熱遠心上清を、カラムクロマトすることなどにより、簡単にタンパク質の精製をすることが出来、非常に経済的である。また、加熱工程を経ることにより、共存している酵素類を失活させる効果も期待できる。

- 本発明のブロッキング効率の向上したタンパク質は、ブロッキング剤、賦形剤、安定化剤、リフォールディング補助剤、コーティング剤、医療用コーティング剤などへ応用可能である。特に、免疫反応を利用した検出システムでのブロッキング剤としての期待が大きく、ELISA、免疫組織染色、ウエスタンブロッティングなどへの使用が可能であると予想される。実際、今回の発明を完成させるにあたり、ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) への応用の可能性を調べたところ、実際に良好な結果を得ている (図12)。
- 20

本発明の一実施形態は、DnaK419-607を含有するブロッキング剤、賦形剤、安定化剤、リフォールディング補助剤である。

- 25 本発明の一実施形態は、DnaK384-607 (D479V、D481V) を含有するブロッキング剤、賦形剤、安定化剤、リフォールディング補助剤である。

以下に、本発明の実施例を例示することによって、本発明の効果をより一層明確なものとする。

実施例1 候補タンパク質のスクリーニング

アミノ酸配列からの候補タンパク質のスクリーニングには、主に核酸・アミノ酸配列解析ソフト：GENETYX（ソフトウェア開発株式会社）を用いて行った。このソフトウェアはタンパク質のアミノ酸一次配列から親水性アミノ酸残基および疎水性アミノ酸残基の数を算出する機能を有しており便利であった。様々なブロッキング能を示すことの判明しているタンパク質、および大腸菌由来のタンパク質もしくは部分配列のN末端側半分とC末端側半分の配列に含有される親水性アミノ酸と疎水性アミノ酸の数をGENETYXにて算出し、親水性アミノ酸含有率、疎水性アミノ酸含有率、親水／疎水率および、二分したそれぞれの親水／疎水率の差の絶対値等をまとめたのが図13および図14である。ここでは、GENETYXの定義に従い、親水性アミノ酸として、アスパラギン酸、グルタミン酸、リジン、ヒスチジン、アルギニン、チロシンとした。また、疎水性アミノ酸としては、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファン、プロリンとした。

15

実施例2 DnaKフラグメントのクローニング、発現

DnaKフラグメントは大腸菌K-12株より抽出したゲノムDNAを鋳型として、PCR法を用いて目的遺伝子断片を増幅し、クローニングした。遺伝子のPCR増幅には東洋紡製のKOD-Plusを用いた。具体的にDnaK 384-638の増幅には、50 μ lの反応液中、反応用バッファー、1mM MgSO₄、配列番号3および4に示すプライマーを15 pmole、ポリメラーゼ1 unitおよび大腸菌DNA 100 ngとなるように調製し、94℃・2分間の後、94℃・15秒、55℃・30秒、68℃・1分のサイクルを25回行った。また同様に、DnaK 386-586の増幅には配列番号3および4に示したプライマーを用いて増幅を行った。増幅したDNA断片は制限酵素BamHIにて消化し、pQE30のBamHI-SmaIサイトへクローニングした（KOD-Plusによって増幅されたDNA断片は平滑化されているため、増幅断片の下流側についてはそのまま使用した）。クローニングした遺伝子の配列はシーケンス解析により確認した。このベクターにクローニングすることにより目的タンパク質のN末端に6×His配列（ヒスチジンタ

25

グ)を付加することができる。このようにして、発現プラスミドpQE-DnaK384-638を作製した。

タンパク質の発現・精製は、遺伝子を導入したJM109をLB培地にて16時間振とう培養し、菌体を遠心分離法により回収し、2.0mM Tris-HCl (pH 7.0) へ懸濁、超音波破碎を行った後、15,000 r. p. m. にて10分間微量高速遠心機を用いて遠心して得られた上清を用いて行った。具体的には、HIS-Select HC Nickel Affinity Gel (SIGMA社製)を用いて、精製し、最終的に2.0mM Tris-HCl (pH7.0) に対して一晩透析し、実験に用いた。タンパク質濃度の測定は、BSAをスタンダードとしたブラッドフォード法を用いて行った(BIORAD社、Bio-Rad Protein Assayキット; 500-0006)。

実施例3 C末端除去DnaKクローンおよびポイントミュータントの作製

C末端除去DnaKクロンの作製は、実施例1で作製したpQE-DnaK384-638を鋳型として用いQuickChange法を用いて任意の場所にストップコドンを導入することにより作製した。実際にはQuickChange site directive mutagenesis kit (stratagene社製)を用い、その取り扱い説明書に従って実施した。それぞれの作製クローンとそれに使用したプライマー配列の組み合わせを以下に示す。DnaK 384-607: 配列番号5と6、DnaK384-578: 配列番号7と8、DnaK384-561: 配列番号9と10。また、DnaK 384-607 (D479V, D481V) はpQE-DnaK384-607を鋳型として用い、配列番号11と12を用いて変異導入を実施した。それぞれ作製した変異体はシーケンス解析により配列を確認した後、実施例1に記載の方法に従って、タンパク質を調製した。

25

実施例4 N末端除去DnaKクロンの作製

実施例2で作成した、pQE-DnaK384-607を鋳型として次に示すプライマーを用いてPCR増幅を行い、実施例1に方法に従って、pQE30ベクターのBamHI-SmaIサイトに導入した。作製したクローンと用いたプライマーのセッ

トは以下のとおりである。DnaK 508-607:配列番号13と2、DnaK 525-607:配列番号14と2、DnaK 419-607:配列番号15と2。それぞれ作製した変異体はシーケンス解析により配列を確認した後、実施例1に記載の方法に従って、タンパク質を調製した。

5

実施例5 ブロッキング効果

ブロッキング効率は以下の方法を用いて測定した。

ポリスチレンプレートへのヒト血清IgGの非特異吸着を指標として検討を実施した。

- 10 方法としては、20mM Tris-HCl (pH7.0) に希釈したBSA (Sigma社、Fraction V) および各種変異体DnaKサンプル 100 μ l をポリスチレン製96ウェルイムノプレート (Costar社製; E. I. A. /R. I. A. 8Well Strip) に添加し、4℃にて4時間静置した (基本的には4時間静置したが、ブロッキング時間を検討する場合は任意の時間を設定した)。その後、プレートから溶液を除去した後、正常人血清をPBS (-) にて50倍希釈し、
- 15 50 μ l を添加、37℃にて1時間インキュベートした。次に、各ウェルを200 μ l の洗浄液 (PBS (-), 0.05% Tween 20) にて4回洗浄し、至適濃度に抗体希釈液 (0.01M PB (pH7.4)、0.15M NaCl、0.5% カゼイン) で希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgG抗体 (Jackson ImmunoResearch社製) 50 μ l を各ウェルに添加し、37℃にて1時間
- 20 インキュベートした。次に、各ウェルを200 μ l の洗浄液 (PBS (-), 0.05% Tween 20) にて4回洗浄し、発色試薬 (テトラメチルベンジジン (TM BZ: 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidine)) を100 μ l 添加、室温で5分間発色させた後、1N硫酸50 μ l を加え反応を停止させた。発色は、ELISAリーダーにて主波長450 nm、副波長650 nmにて測定
- 25 した。タンパク質の定量にはブラッドフォード法を用いた。

まず、0.7mg/ml に調製したBSA、DnaK 384-638、DnaK 384-607、DnaK 384-578、DnaK 508-607、DnaK 525-607について、4時間でのブロッキング効率を測定したところ、図

5に示すように、BSA、DnaK 384-638、DnaK 384-607以外のものについては、ブロッキング効果が低い結果であった。ブロッキング効果が低かったクローンは、DnaK 384-607、DnaK 384-578については、 α ヘリックスを削ったクローン、DnaK 508-607、DnaK 525-607は β シートを削ったクローンであり、DnaKの基質結合ドメインを用いるブロッキングには α ヘリックス構造と β シート構造の両方が必要であることが推察された。

次に、 β シート部分の疎水性を向上させる目的で作製した、DnaK 384-607 (D479V, D481V) とDnaK 419-607 (それぞれ0.7mg/ml) と同濃度のBSAとDnaK 384-607をコントロールとして、ブロッキング4時間でのブロッキング効果を比較した。その結果、DnaK 384-607 (D479V, D481V)、DnaK 419-607ともに、同濃度のBSAよりもブロッキング効率が高く、特にDnaK 419-607で顕著であった (図9)。

更に、上記実験で最も効果の高かったDnaK 419-607とDnaK 384-638、BSAについて、ブロッキング濃度とブロッキング4時間目でのブロッキング効果について調べた。その結果、0.15mg/mlのDnaK 419-607は12mg/mlのBSAよりもブロッキング効果が顕著であり、非常に低濃度でブロッキング剤として使用可能であることが示唆された (図10)。

最後に、更に、上記実験で最も効果の高かったDnaK 419-607とDnaK 384-638、BSAについて、ブロッキング時間とブロッキング効果について検討を行った。タンパク質濃度は、DnaK 419-607とDnaK 384-638については0.7mg/mlとし、BSAは上記検討で0.7mg/mlのDnaK 419-607と同等のブロッキング効果を示した2.4mg/mlで用いた。その結果、DnaK 419-607のブロッキングに要する時間が飛躍的に短く約10分程度で十分効果的なブロッキング効果が得られ、3時間後に同等の効果の見られた2.4mg/mlのBSAより早くブロッキング効果を示すことが分かった (図11)。

実施例6 ブロッキング効果 (ELISA)

ヒト癌胎児性抗原 (Carcinoembryonic antibody: hCEA) のELISAシステムを用いてDnaKフラグメントのブロッキング剤としての有用性を検討した。まず、抗hCEA MoAbを50mM炭酸緩衝液 (pH9.6) で10 μ g/mlに希釈後、100 μ lづつポリスチレン製96ウェルイムノプレート (Costar社製; E. I. A. /R. I. A 8Well Strip) へ添加後、37 $^{\circ}$ C・1時間静置した。静置後、洗浄液 (PBS (-), 0.05% Tween 20) 150 μ lにて3回ウェルを洗浄した後、ブロック液を200 μ lづつ添加し、4 $^{\circ}$ C・4時間静置した。ブロック液としては、一般的に使用される2.4mg/mlのBSA (20mM Tris-HCl (pH7.0)), および同様の緩衝液に溶解したDnaK 419-607を用い、ブランクは20mM Tris-HCl (pH7.0で行った。ブロック液廃棄後、0、2.5ng/ml、5ng/mlに希釈したhCEA溶液 (イムノフローラ: 東洋紡製) を50 μ lづつ添加し、37 $^{\circ}$ Cにて1時間インキュベート後、150 μ lの洗浄液にて4回洗浄実施した。その後、至適濃度に希釈したペルオキシダーゼ標識抗hCEA抗体 (イムノフローラ: 東洋紡製) を添加、37 $^{\circ}$ C・1h反応後、さらに洗浄液 (PBS (-), 0.05% Tween 20) 150 μ lにて3回ウェルを洗浄した。次に、基質溶液 (テトラメチルベンジジン (TMBZ: 3, 3', 5, 5'-Tetramethyl benzidine)) 100 μ lを添加し、遮光して37 $^{\circ}$ C、20分間発色させた。最後に、反応停止液 (1N H₂SO₄) 100 μ lを添加し、黄色の発色を450nm/650nmで測定した。

その結果、ブランクでは測定の直線性が失われているのに対し、DnaK 419-607はBSA同様に直線性の良い結果が得られ、本発明のDnaK 419-607が免疫学的測定にも十分適用し得ることが示された (図12)。

25

実施例7 ヒスチジインタグなし (native) のDnaKフラグメントのブロッキング効果の比較

実施例2~4で構築したDnaKフラグメントはいずれも発現ベクターpQE30に由来するヒスチジインタグをN末端に有している事より、DnaKフラグメントの

等電点が中性pHへシフトしている。そのため、本来の静電相互作用によるブロッキング能も維持できるようヒスチジントグを削除したDnaKフラグメントを構築した。

ヒスチジントグ除去DnaKクローンの作製は、実施例5で作製したpQE-DnaK419-607を鋳型として用いQuickChange法を用いて開始コドンの後ろからヒスチジントグを含むDnaK領域までのアミノ酸を削除して作製した。実際にはQuickChange site directive mutagenesis kit (stratagene社製)を用い、ヒスチジントグの上流にBamHIサイトを導入した。操作は、その取り扱い説明書に従って実施した。その際の使用したプライマー配列を配列番号16、17に示す。実施例2にも示したが、クローニングした遺伝子の上流側にもBamHIサイトを設けてある。よって、BamHIで得られたベクターを消化し、再結合することにより、ヒスチジントグ配列を除去したクローンを得ることができる。

この発現ベクターはpQE-DnaK419-607Nと命名した。またnativeなDnaK419-607フラグメントの調製は、このpQE-DnaK419-607Nにて大腸菌JM109を形質転換した形質転換体を培養して取得した。

すなわち、大腸菌JM109(pQE-DnaK419-607N)を100mg/Lのアンピシリンを含むトレフィックブロス(1.2%ポリペプトン、2.4%酵母エキス、0.5%グリセロール、17mMリン酸1カリウム、72mMリン酸2カリウム)に植菌し32℃で20時間しんとう培養した。本培養液1L分の菌体を遠心分離により集菌し、200mlの100mM Tris塩酸緩衝液、pH9.0に懸濁し、フレンチプレスにより破碎した。本破碎液に終濃度0.1%になるようポリエチレンイミンを添加後60℃で2時間加温し、遠心分離により上清を回収した。次いで50%飽和度の硫酸を添加し、遠心分離により沈殿物を回収後、100mM Tris塩酸緩衝液、pH9.0で再溶解した。更に、64℃で14時間加温処理し遠心分離により上清を回収した。この粗酵素液をSuperdex200(アマシャムバイオサイエンス社製)ゲルろ過クロマトグラフィーに供し、次いで50%飽和度の硫酸を添加して沈殿を回収後、100mM Tris塩酸緩衝液、pH9.0で再溶解した。同緩衝液で緩衝化したSephadex G-25(アマシャムバイオサイエ

5 ンス社製) ゲルろ過クロマトグラフィーで脱塩した。次にこのDnaKフラグメントを20%飽和度硫酸を含む100mM Tris塩酸緩衝液、pH9.0で緩衝化したPhenyl Sepharose Fast Flow(アマシャムバイオサイエンス社製)カラムクロマトグラフィーに供し20%~0%飽和度硫酸のリニアグラジェントによる溶出を行い、精製DnaKフラグメント画分を取得した。本精製フラグメント画分を限外ろ過膜で濃縮した後、蒸留水により脱塩して最終精製DnaKフラグメントを取得した。

BSAとnative DnaK419-607フラグメントのブロッキング効率の比較は以下の方法により測定した。

10 まず西洋ワサビ由来の標識用ペルオキシダーゼ(東洋紡績(株)製PEO-131)をBSAまたはnative DnaK419-607フラグメントを含むPBS緩衝液に2mg/mlになるよう溶解した。その際、市販品BSA(フラクシオンV)は2または10mg/ml、native DnaK419-607フラグメントは0.1または0.5mg/mlの濃度に調整した。次いで、同溶液によりペルオキシダーゼ溶解液の40~320倍まで希釈系列を作成し、それぞれの希釈液100μl
15 をポリスチレン製96穴マイクロプレートに分注した。室温で1時間放置した後に溶液を除去し、0.02% Tween20を含むPBS緩衝液200μlで洗浄した。この洗浄操作を6回繰り返した後、良く洗浄液を取り除いた。次いで、100μlのテトラメチルペンチジン(Bio-Rad社製)を添加し、37℃で正確に10分間
20 インキュベートした後、1Nの硫酸100μlを添加し反応停止並びに発色させた。この発色はマイクロプレートリーダーにて主波長450nm、副波長650nmにて測定した。

その結果を図15~図17に示したが、native DnaK419-607フラグメントはBSAの1/20の濃度でBSAと同等の非特異発色抑制を示した事
25 より、BSAの約20倍のブロッキング能を示す事が明らかとなった。

産業上の利用可能性

本発明によれば、アミノ酸配列情報を元にブロッキング能を有する新規タンパク質または部分配列タンパク質を簡便にスクリーニングできるようになり、また、大腸菌

で大量発現可能なブロッキング効率の向上したタンパク質の生産が可能となった。本発明によって得られたタンパク質はブロッキング能が高く、従来法に比べ、簡便かつ確実な結果が得られる。本発明は、免疫的測定を応用する臨床診断や、医療などの分野に大きな寄与を与える。

5

10

15

20

25

請求の範囲

1. アミノ酸配列情報を元にブロッキング能を有する新規なブロッキング用タンパク質または部分配列タンパク質候補をスクリーニングする方法であって、以下の条件を満たすタンパク質もしくは部分配列タンパク質をスクリーニングする方法：

- 5 A. タンパク質のアミノ酸配列を2分し、それぞれの親水性アミノ酸（D, E, K, H, R, Y）と疎水性アミノ酸（G, A, V, L, I, M, F, W, P）の含有率から以下の式を用いて算出された2分された各部分での親水／疎水率の差の絶対値が0.1以上である；

$$\cdot (\text{親水／疎水率}) = (\text{親水性アミノ酸含有率}) / (\text{疎水性アミノ酸含有率})$$

- 10 B. 親水性部分の親水／疎水率（親水／疎水率の高い方の値）が0.5以上；
 C. 100残基より多くのアミノ酸よりなる。

2. 請求項1の方法によってスクリーニングされたブロッキング能を有する新規なブロッキング用タンパク質または部分配列タンパク質であって、以下Dの解析工程により得ることができる、以下のEの条件を満たすタンパク質または部分配列タンパク質：

- 15 D. （1）ポリスチレン製イムノタイタープレートのそれぞれのウェルに請求項1の条件を満たす候補タンパク質（0.5～1mg/ml：20mM Tris-HCl（pH7.0）に希釈）および同様に調製したウシ血清アルブミン（Fraction V）を添加し、2℃～10℃で4～5時間ブロッキングし、液を廃棄する工程；

20 （2）PBS（-）で25～100倍希釈した正常ヒト血清を添加し、37℃にて1時間放置した後に、プレートをPBS（-）（0.05%Tween20）にて洗浄する工程；

- （3）酵素標識した抗ヒトIgG抗体を用いて非特異的にプレートに吸着したIgG量を発色法を用いた比色法にて比較する工程；

25 E 候補タンパク質での発色がウシ血清アルブミンの発色の2.5倍以下である。

3. 請求項1の方法によってスクリーニングされたブロッキング能を有する新規なブロッキング用タンパク質または部分配列タンパク質であって、以下Fの解析工程に

より得ることができる、以下のGの条件を満たすタンパク質または部分配列タンパク質：

D. (1) 西洋ワサビ由来の標識用ペルオキシダーゼを候補タンパク質溶液(0.5~1mg/ml:PBS(-)に希釈)および同様に調製したウシ血清アルブミン(Fraction V)に0.05mg/mlになるよう溶解する工程；

(2) 上記希釈液をポリスチレン製96穴マイクロプレートに分注する工程；

(3) 1時間、25℃で放置した後に、溶液を除去し、0.02% Tween 20を含むPBS(-)で洗浄する工程；

10 (4) テトラメチルベンチジン溶液を添加し、37℃でインキュベートした後、1Nの硫酸を添加し反応停止並びに発色させる工程；

(5) 発色をマイクロプレートリーダーにて測定する工程；

G. 候補タンパク質での測定値が、ウシ血清アルブミンの発色の2.5倍以下である。

15 4. 請求項1の方法によってスクリーニングされたブロッキング能を有する新規なブロッキング用タンパク質または部分配列タンパク質であって、以下Hの解析工程により得ることができる、以下のIの条件を満たすタンパク質または部分配列タンパク質：

H. (1) ポリスチレン製イムノタイタープレートのそれぞれのウェルに請求項1の条件を満たす候補タンパク質(0.5~1mg/ml:PBS(-)に希釈)および同様に調製したウシ血清アルブミン(Fraction V)を添加し、2℃~10℃で4~5時間ブロッキングし、液を廃棄する工程；

20 (2) 0.05mg/mlに調製したペルオキシダーゼ溶液を添加し、37℃にて1時間放置した後に、プレートをPBS(-)(0.05% Tween 20)にて洗浄する工程；

(3) 1時間、25℃で放置した後に、溶液を除去し、0.02% Tween 20を含むPBS(-)で洗浄する工程；

(4) テトラメチルベンチジン溶液を添加し、37℃でインキュベートした後、1Nの硫酸を添加し反応停止並びに発色させる工程；

(5) 発色をマイクロプレートリーダーにて測定する工程；

I. 候補タンパク質での測定値が、ウシ血清アルブミンの発色の2.5倍以下である。

5. 請求項1に記載の条件A, B, Cを満たすタンパク質または部分配列タンパク質のアミノ酸配列の改変によりブロッキング効率を向上させた新規なタンパク質。
6. アミノ酸配列改変がアミノ酸置換、除去、挿入によるものであることを特徴とする請求項5に記載のブロッキング効率の向上したタンパク質。
7. 原核生物もしくは真核生物由来であることを特徴とする請求項5に記載のブロッキング効率の向上したタンパク質。
- 10 8. 「HSP70ファミリータンパク質」由来であることを特徴とするブロッキング効率の向上したタンパク質。
9. DnaKタンパク質由来であることを特徴とする請求項8に記載のブロッキング効率の向上したタンパク質。
- 10 10. DnaKタンパク質の一部のアミノ酸配列を除去したタンパク質であることを特徴とする請求項8に記載のブロッキング効率の向上したタンパク質。
11. DnaKタンパク質の一部のアミノ酸配列を除去したタンパク質であって、少なくともN末端から387番目まで、多くとも472番目までのアミノ酸配列を除去したことを特徴とする請求項8に記載のブロッキング効率の向上したタンパク質。
12. DnaKタンパク質の一部のアミノ酸配列を除去したタンパク質であって、20 少なくともN末端から387番目まで、多くとも418番目までのアミノ酸配列を除去したことを特徴とする請求項8に記載のブロッキング効率の向上したタンパク質。
13. DnaKタンパク質の419～607番目までのアミノ酸配列からなる請求項8に記載のタンパク質
14. ATPaseドメインもしくはその一部を除去したDnaKタンパク質の一部の親水性アミノ酸を疎水性アミノ酸に置換したことを特徴とする請求項8に記載25 のブロッキング効率の向上したタンパク質。
15. ATPaseドメインもしくはその一部を除去したDnaKタンパク質の一部のアミノ酸配列を除去したタンパク質であって、アミノ酸番号479と481のアスパラギン酸をパリンに置換した請求項8に記載のブロッキング効率の向上したタ

ンパク質。

16. DnaKタンパク質の384～607番目のアミノ酸配列からなり、アミノ酸番号479と481のアスパラギン酸をバリンに置換した請求項8に記載のブロッキング効率の向上したタンパク質。

- 5 17. 1以上の親水性ドメインと1以上の疎水性ドメインを有するブロッキング用タンパク質であって、疎水性ドメインが器壁に吸着可能であり、親水性ドメインが器壁に吸着した疎水性ドメインを覆うことが可能であるブロッキング用タンパク質。

18. ブロッキング速度がBSAよりも向上していることを特徴とする改変されたタンパク質。

- 10 19. 3時間のブロッキングにおいてBSAと同等のブロッキング効率を示すようにタンパク質量を揃えた条件において、10分未満のブロッキング能がBSAよりも優れることを特徴とする請求項18に記載の改変されたタンパク質。

20. タグ配列を有することを特徴とする請求項2～19のいずれかに記載のタンパク質。

- 15 21. タグ配列がヒスチジンタグ、マルトースバインディングプロテイン(MBP)タグ、グルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)タグ、Flagタグ、Mycタグ、タンデムアフィニティーピュリフィケーションタグから選択されることを特徴とする請求項20に記載のタンパク質。

- 20 22. 任意のアミノ酸配列が付加されたことを特徴とする請求項2～19のいずれかに記載のタンパク質。

23. 原核生物を用いて請求項2～22のいずれかに記載のタンパク質を生産することを特徴とするタンパク質の生産方法。

24. 大腸菌を用いて請求項2～22のいずれかに記載のタンパク質を生産することを特徴とするタンパク質の生産方法。

- 25 25. 無細胞タンパク質合成法を用いて請求項2～22のいずれかに記載のタンパク質を生産することを特徴とするタンパク質の生産方法。

26. 加熱工程を経ることを特徴とする請求項2～22のいずれかに記載のタンパク質の精製方法。

27. 請求項2～22のいずれかに記載のタンパク質をブロッキング、安定化、賦

形、フォールディング補助、リフォールディング補助、コーティング、医療用に使用する方法。

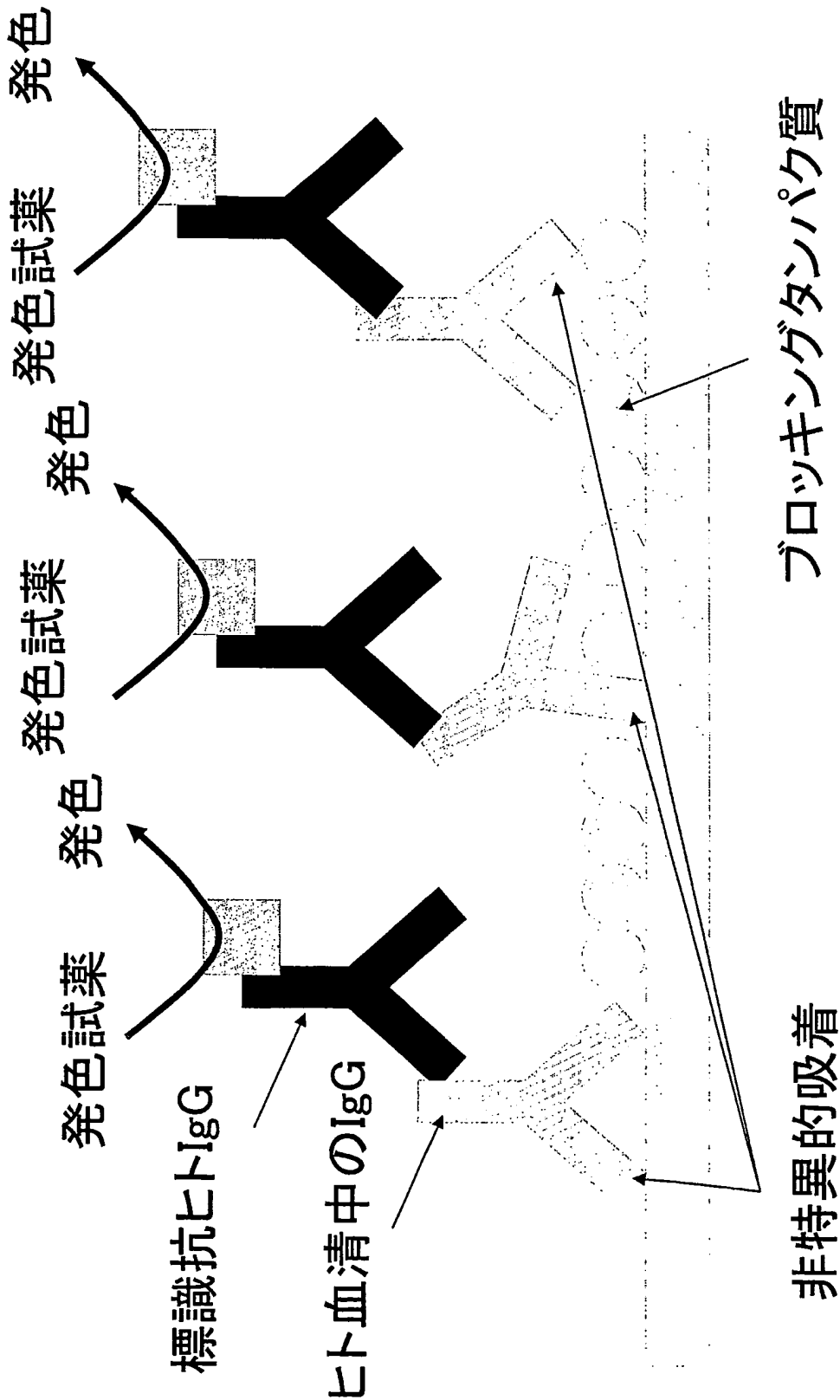
28. 請求項2～22のいずれかに記載のタンパク質を含有するブロッキング試薬、安定化剤、賦形剤、フォールディング補助剤、リフォールディング補助剤、コーティング剤または医療用コーティング剤。

10

15

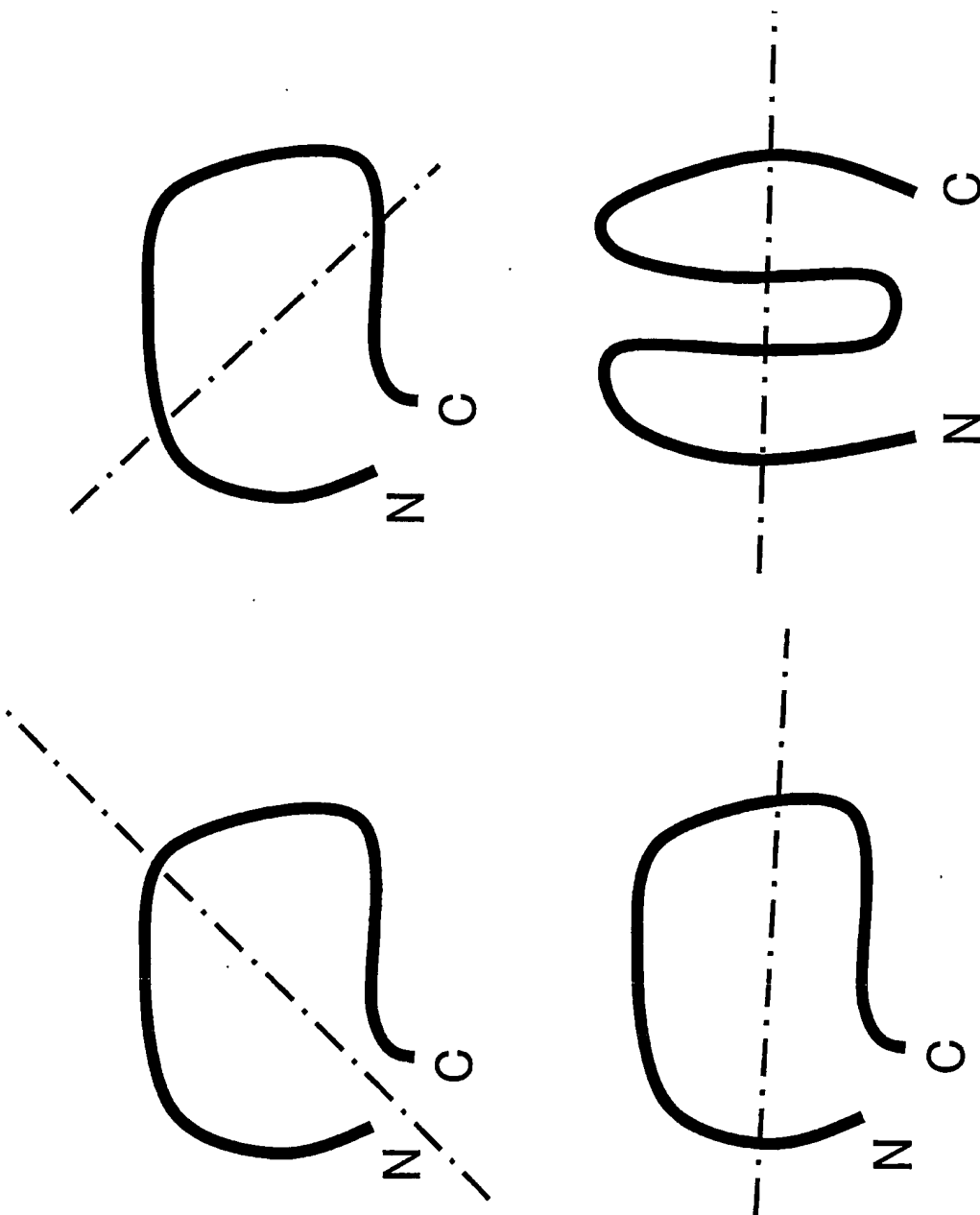
20

25

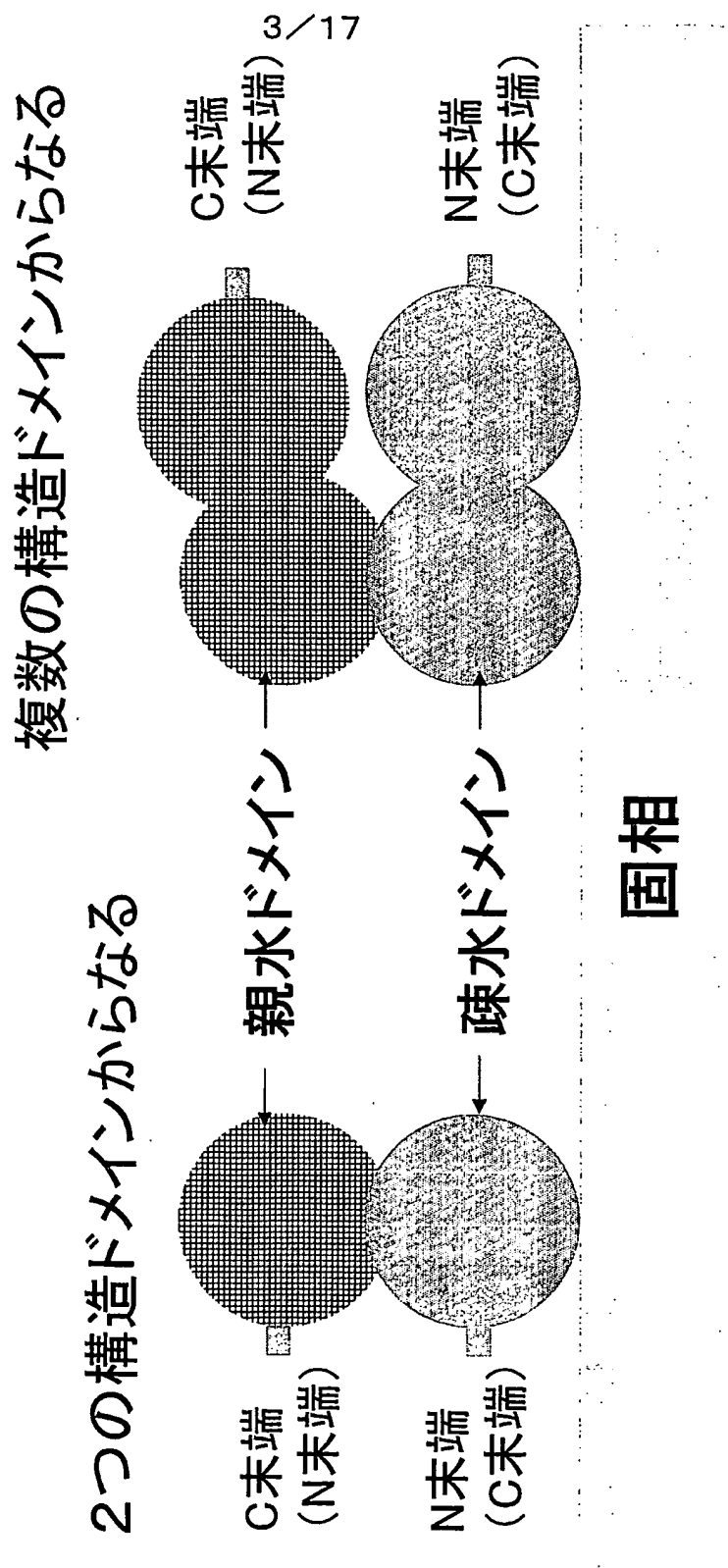


【図1】

2/17

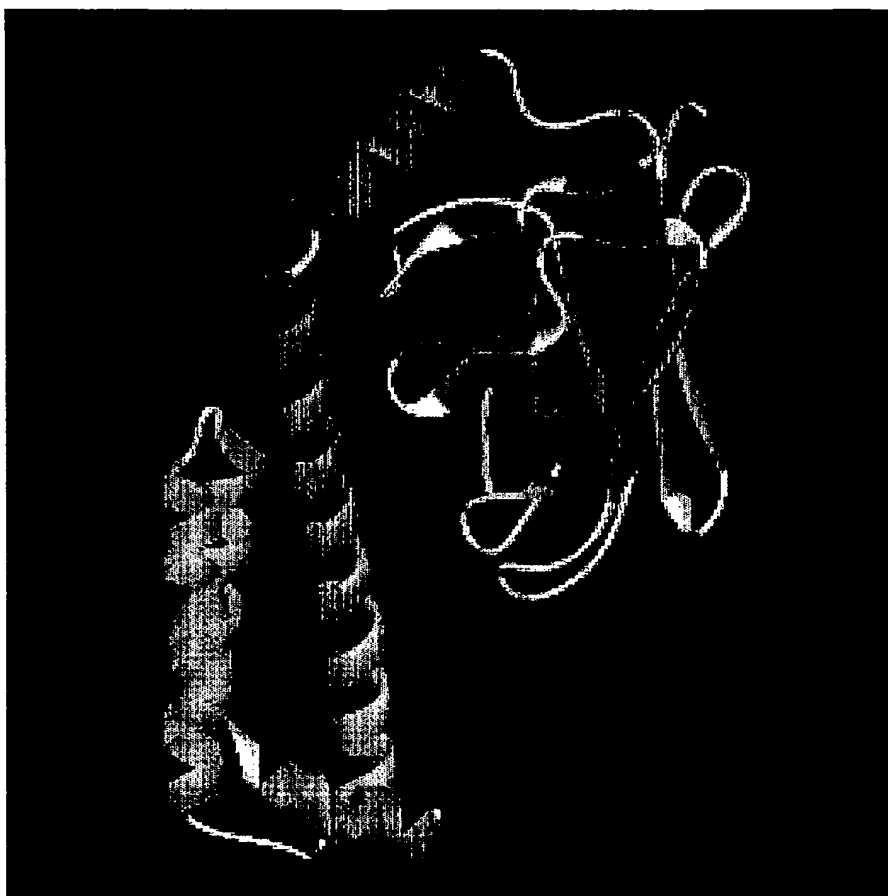


【図2】



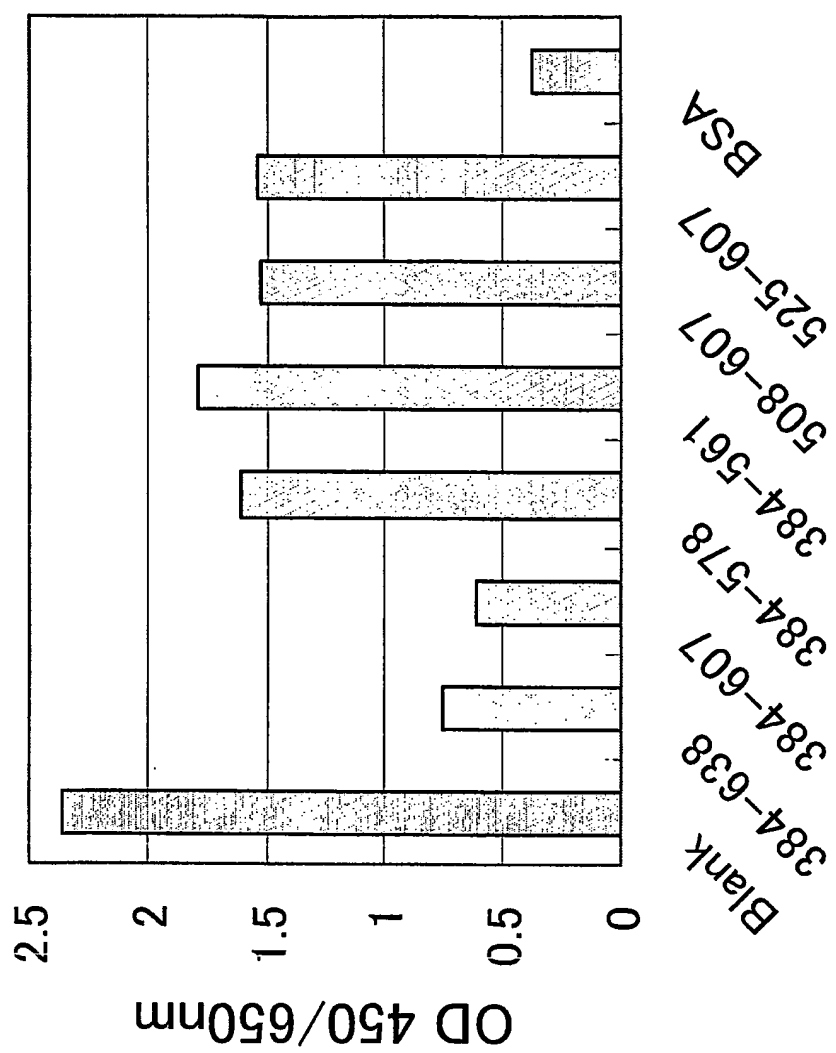
【図3】

4/17

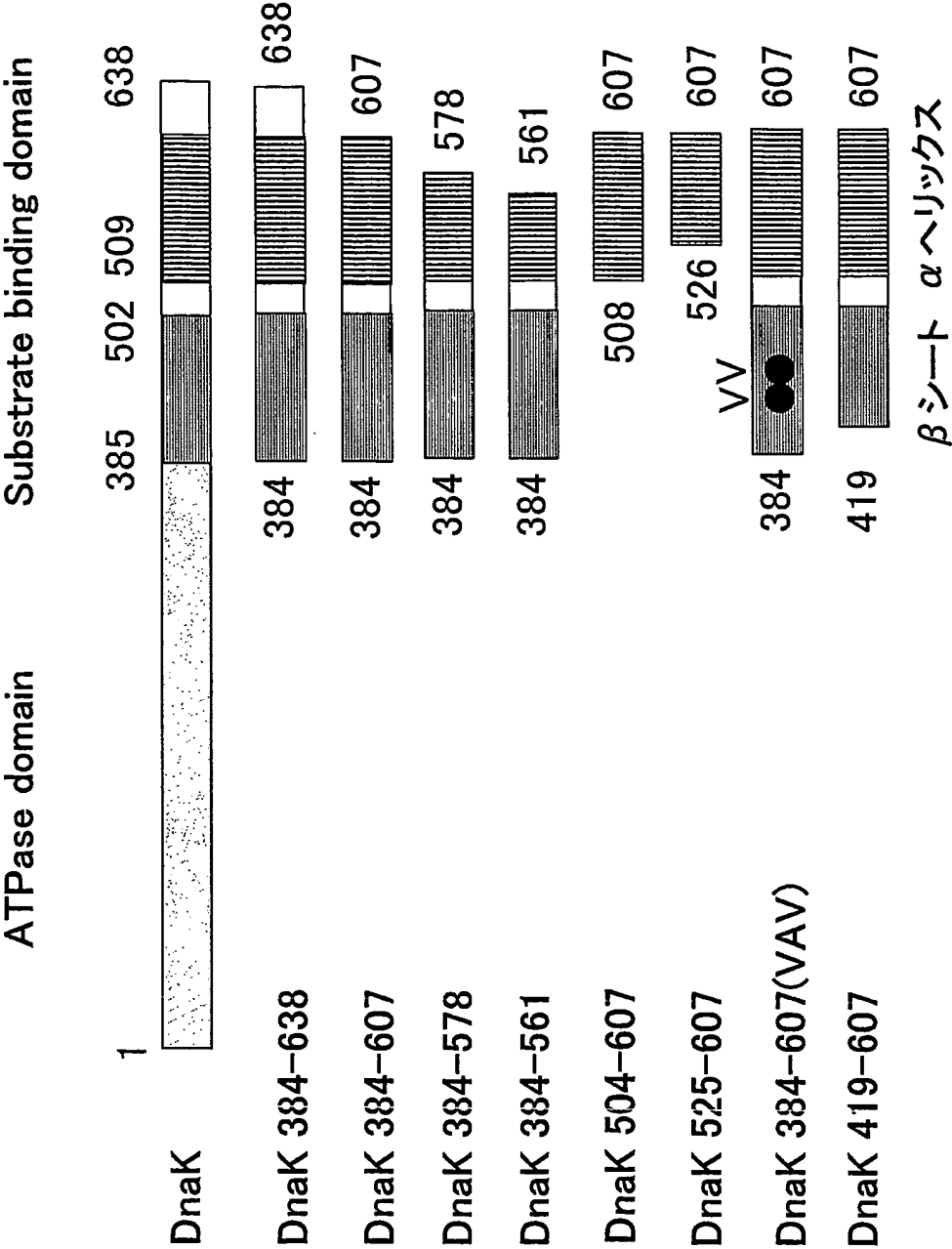


【図4】

5/17



【図5】



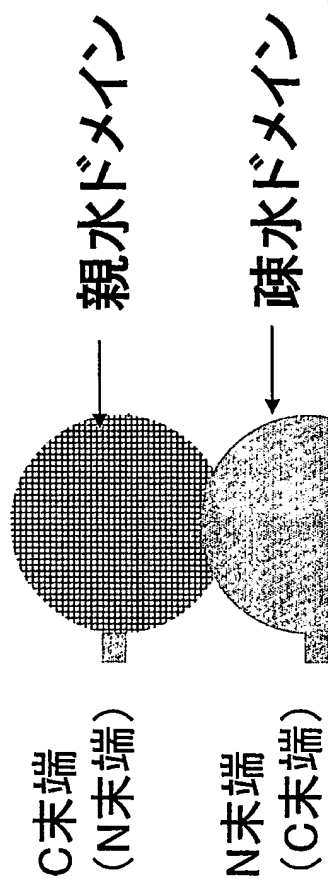
【図6】

7/17



【図7】

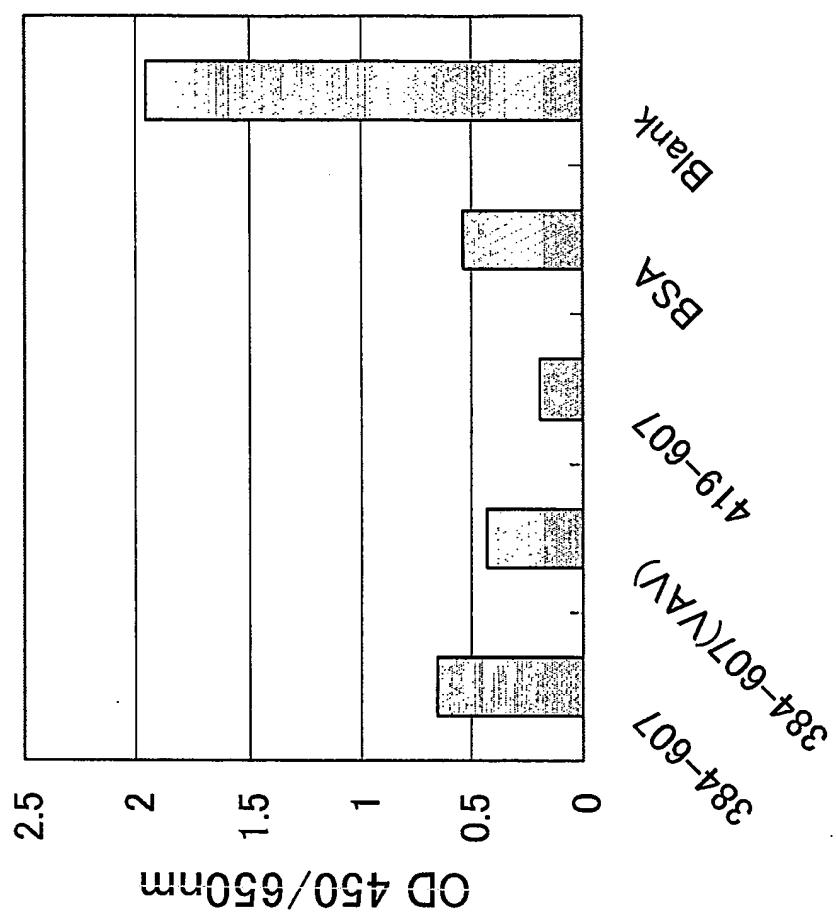
8/17



固相

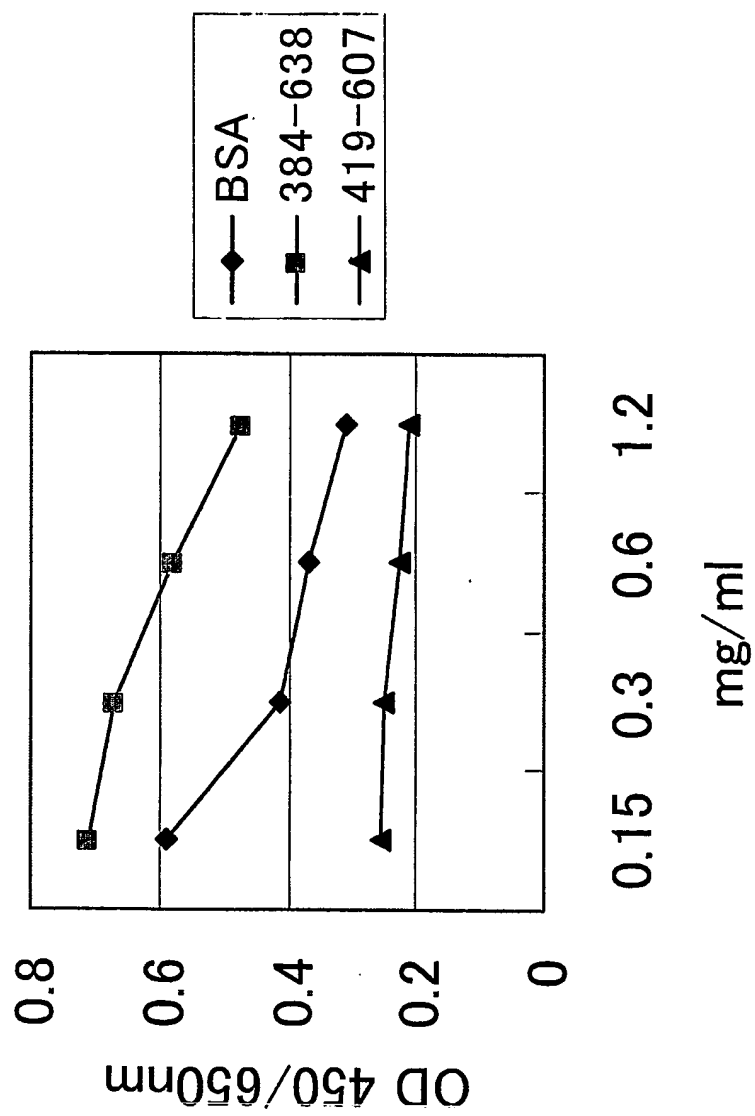
【図8】

9/17

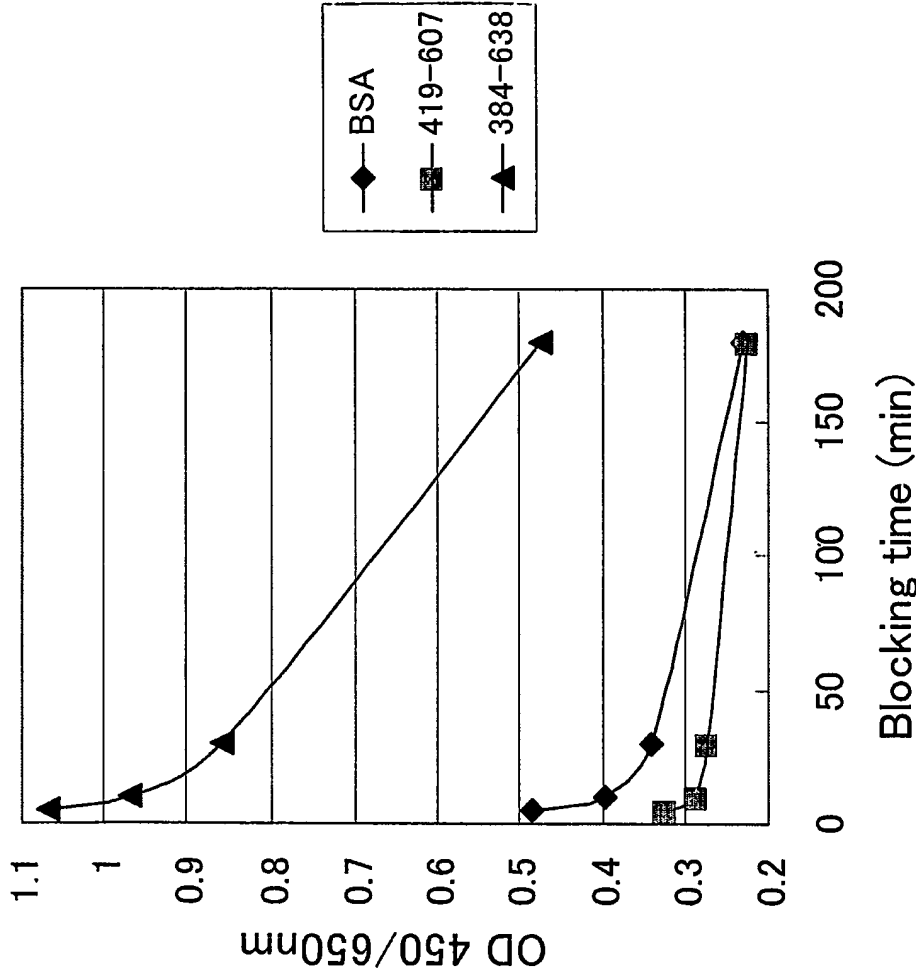


【6】

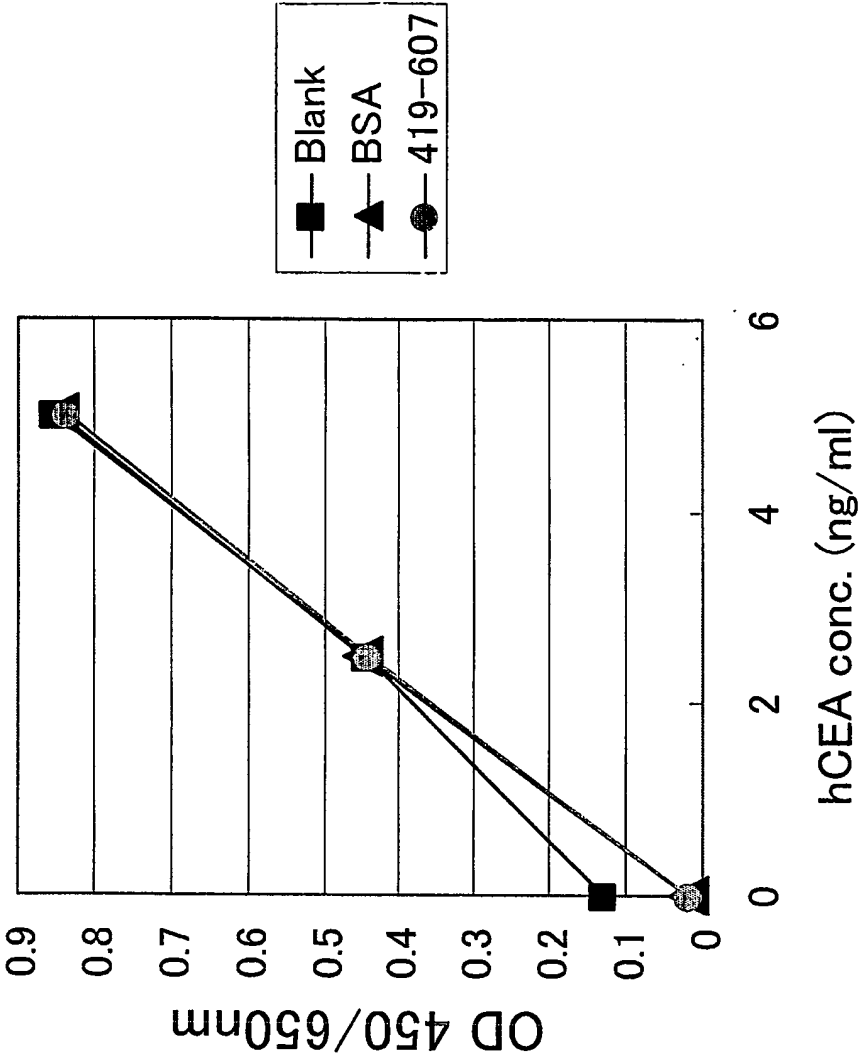
10/17



【図10】



【図11】



【図12】

図 13

	BSA	α カゼイン	リパーゼ
親水性アミノ酸含有率	0.37	0.34	0.21
疎水性アミノ酸含有率	0.41	0.45	0.51
親水/疎水率	0.90	0.76	0.41
ブロッキング能	○	○	×

14/17

図 14

	BSA			α カゼイン			リパーゼ			DnaK 384-607		
	N 末 端側	C 末 端側	全長	N 末 端側	C 末 端側	全長	N 末 端側	C 末 端側	全長	N 末 端側	C 末 端側	全長
親水性アミノ 酸含有率	0.40	0.35	0.37	0.37	0.30	0.34	0.22	0.20	0.21	0.25	0.37	0.29
疎水性アミノ 酸含有率	0.40	0.42	0.41	0.42	0.47	0.45	0.57	0.45	0.51	0.50	0.41	0.45
親水/疎水率	1.00	0.83	0.90	0.88	0.64	0.76	0.39	0.44	0.41	0.50	0.90	0.64
Δ	0.17			0.24			0.05			0.40		

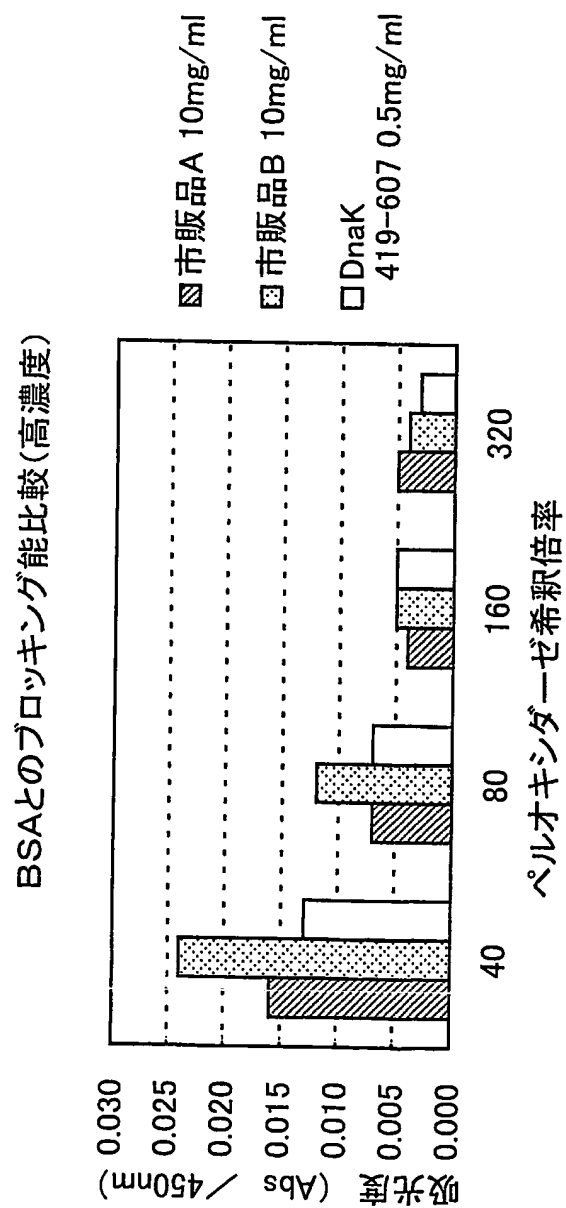
図15

実施例7 Hisタグなし(native)のDnaKフラグメントのブロッキング効果のBSAとの比較						
PEO131 希釈倍率	高濃度			低濃度		
	市販品A 10mg/ml	市販品B 10mg/ml	DnaK 419-607 0.5mg/ml	市販品A 2mg/ml	市販品B 2mg/ml	DnaK 419-607 0.1mg/ml
40	0.016	0.024	0.013	0.068	0.094	0.086
80	0.007	0.012	0.007	0.036	0.046	0.069
160	0.004	0.005	0.005	0.017	0.021	0.024
320	0.005	0.004	0.003	0.012	0.013	0.014

表内の値: 450nmの吸光度(Abs)

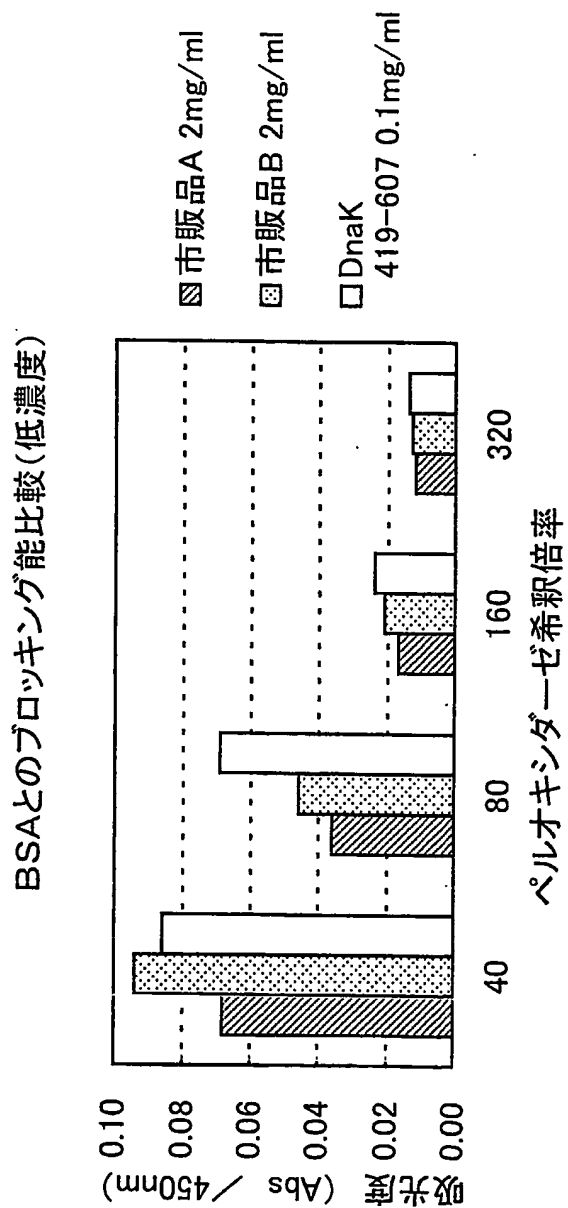
16/17

図16



17/17

図17



SEQUENCE LISTING

<110> Toyo Boseki Kabushiki Kaisya

＜120＞ブロッキング効率の向上したタンパク質

<130> 040012PC1

<160> 16

<170> PatentIn version 2.1

<210> 1

<211> 638

<212> PRT

<213> Escherichia coli

$\langle 400 \rangle$ 1

Met Gly Lys Ile Ile Gly Ile Asp Leu Gly Thr Thr Asn Ser Cys Val

1 5 10 15

Ala Ile Met Asp Gly Thr Thr Pro Arg Val Leu Glu Asn Ala Glu Gly

20 25 30

Asp Arg Thr Thr Pro Ser Ile Ile Ala Tyr Thr Gln Asp Gly Glu Thr

35 40 45

Leu Val Gly Gln Pro Ala Lys Arg Gln Ala Val Thr Asn Pro Gln Asn

50 55 60

Thr Leu Phe Ala Ile Lys Arg Leu Ile Gly Arg Arg Phe Gln Asp Glu

65 70 75 80

Glu Val Gln Arg Asp Val Ser Ile Met Pro Phe Lys Ile Ile Ala Ala

85 90 95

Asp Asn Gly Asp Ala Trp Val Glu Val Lys Gly Gln Lys Met Ala Pro

100 105 110

Pro Gln Ile Ser Ala Glu Val Leu Lys Lys Met Lys Lys Thr Ala Glu

115 120 125

Asp Tyr Leu Gly Glu Pro Val Thr Glu Ala Val Ile Thr Val Pro Ala
 130 135 140
 Tyr Phe Asn Asp Ala Gln Arg Gln Ala Thr Lys Asp Ala Gly Arg Ile
 145 150 155 160
 Ala Gly Leu Glu Val Lys Arg Ile Ile Asn Glu Pro Thr Ala Ala Ala
 165 170 175
 Leu Ala Tyr Gly Leu Asp Lys Gly Thr Gly Asn Arg Thr Ile Ala Val
 180 185 190
 Tyr Asp Leu Gly Gly Gly Thr Phe Asp Ile Ser Ile Ile Glu Ile Asp
 195 200 205
 Glu Val Asp Gly Glu Lys Thr Phe Glu Val Leu Ala Thr Asn Gly Asp
 210 215 220
 Thr His Leu Gly Gly Glu Asp Phe Asp Ser Arg Leu Ile Asn Tyr Leu
 225 230 235 240
 Val Glu Glu Phe Lys Lys Asp Gln Gly Ile Asp Leu Arg Asn Asp Pro
 245 250 255
 Leu Ala Met Gln Arg Leu Lys Glu Ala Ala Glu Lys Ala Lys Ile Glu
 260 265 270
 Leu Ser Ser Ala Gln Gln Thr Asp Val Asn Leu Pro Tyr Ile Thr Ala
 275 280 285
 Asp Ala Thr Gly Pro Lys His Met Asn Ile Lys Val Thr Arg Ala Lys
 290 295 300
 Leu Glu Ser Leu Val Glu Asp Leu Val Asn Arg Ser Ile Glu Pro Leu
 305 310 315 320
 Lys Val Ala Leu Gln Asp Ala Gly Leu Ser Val Ser Asp Ile Asp Asp
 325 330 335
 Val Ile Leu Val Gly Gly Gln Thr Arg Met Pro Met Val Gln Lys Lys
 340 345 350
 Val Ala Glu Phe Phe Gly Lys Glu Pro Arg Lys Asp Val Asn Pro Asp

355	360	365
Glu Ala Val Ala Ile Gly Ala Ala Val Gln Gly Gly Val Leu Thr Gly		
370	375	380
Asp Val Lys Asp Val Leu Leu Leu Asp Val Thr Pro Leu Ser Leu Gly		
385	390	395
Ile Glu Thr Met Gly Gly Val Met Thr Thr Leu Ile Ala Lys Asn Thr		
405	410	415
Thr Ile Pro Thr Lys His Ser Gln Val Phe Ser Thr Ala Glu Asp Asn		
420	425	430
Gln Ser Ala Val Thr Ile His Val Leu Gln Gly Glu Arg Lys Arg Ala		
435	440	445
Ala Asp Asn Lys Ser Leu Gly Gln Phe Asn Leu Asp Gly Ile Asn Pro		
450	455	460
Ala Pro Arg Gly Met Pro Gln Ile Glu Val Thr Phe Asp Ile Asp Ala		
465	470	475
Asp Gly Ile Leu His Val Ser Ala Lys Asp Lys Asn Ser Gly Lys Glu		
485	490	495
Gln Lys Ile Thr Ile Lys Ala Ser Ser Gly Leu Asn Glu Asp Glu Ile		
500	505	510
Gln Lys Met Val Arg Asp Ala Glu Ala Asn Ala Glu Ala Asp Arg Lys		
515	520	525
Phe Glu Glu Leu Val Gln Thr Arg Asn Gln Gly Asp His Leu Leu His		
530	535	540
Ser Thr Arg Lys Gln Val Glu Glu Ala Gly Asp Lys Leu Pro Ala Asp		
545	550	555
Asp Lys Thr Ala Ile Glu Ser Ala Leu Thr Ala Leu Glu Thr Ala Leu		
565	570	575
Lys Gly Glu Asp Lys Ala Ala Ile Glu Ala Lys Met Gln Glu Leu Ala		
580	585	590

Gln Val Ser Gln Lys Leu Met Glu Ile Ala Gln Gln Gln His Ala Gln

595

600

605

Gln Gln Thr Ala Gly Ala Asp Ala Ser Ala Asn Asn Ala Lys Asp Asp

610

615

620

Asp Val Val Asp Ala Glu Phe Glu Glu Val Lys Asp Lys Lys

625

630

635

<210> 2

<211> 1917

<212> DNA.

<213> Escherichia coli

<400> 2

```

atgggtaaaa taattggtat cgacctgggt actaccaact ctgtgttagc gattatggat   60
ggcaccactc ctgcgtgct ggagaacgcc gaaggcgatc gcaccacgcc ttctatcatt  120
gcctataccc aggatggtga aactctagtt ggtcagccgg ctaaacgtca ggcagtgacg  180
aaccgcgaaa acactctgtt tgcgattaaa cgcttgattg gtcgccgctt ccaggacgaa  240
gaagtacagc gtgatgtttc catcatgccg ttcaaaatta ttgctgctga taacggcgac  300
gcatgggtcg aagttaaagg ccagaaaatg gcaccgccgc agatttctgc tgaagtgtc  360
aaaaaaatga agaaaaccgc tgaagattac ctgggtgaac cggtaactga agctgttatt  420
accgtaccgg catactttta cgatgctcag cgtcaggcaa ccaaagacgc aggccgtatc  480
gctggtctgg aagtaaaacg tatcatcaac gaaccgaccg cagctgcgct ggcttacggt  540
ctggacaaaag gcactggcaa ccgtactatc gcggtttatg acctgggtgg tggtaacttc  600
gatatttcta ttatcgaaat cgacgaagtt gacggcgaaa aaaccttcga agttctggca  660
accaacggtg ataccacct ggggggtgaa gacttcgaca gccgtctgat caactatctg  720
gttgaagaat tcaagaaaga tcagggcatt gacctgcgca acgatccgct ggcaatgcag  780
cgcttgaaag aagcggcaga aaaagcgaaa atcgaactgt cticcgtca gcagaccgac  840
gttaacctgc catacatcac tgcagacgcg accggtccga aacacatgaa catcaaagt  900
actcgtcgga aactggaaag cctggttgaa gatctggtaa accgttccat tgagccgctg  960
aaagttgcac tgcaggacgc tggcctgtcc gtatctgata tcgacgacgt tatcctcgtt 1020

```

ggtaggtcaga ctcgatgcc aatgggtcag aagaaagttg ctgagttctt tggtaaagag 1080
ccgcgtaaag acgttaaccc ggacgaagct gtagcaatcg gtgctgctgt tcagggtggt 1140
gttctgactg gtgacgtaaa agacgtactg ctgctggacg ttaccccgct gtctctgggt 1200
atcgaaacca tgggcgggtgt gatgacgacg ctgatcgca aaaacaccac tatcccgacc 1260
aagcacagcc aggtgttctc taccgtgaa gacaaccagt ctgcggtaac catccatgtg 1320
ctgcagggtg aacgtaaacg tgcggctgat aacaaatctc tgggtcagtt caacctagat 1380
ggtatcaacc cggcaccgcg cggcatgccg cagatcgaag ttaccttcga tatcgatgct 1440
gacggtatcc tgcacgtttc cgcgaaagat aaaaacagcg gtaaagagca gaagatcacc 1500
atcaaggctt ctcttggtct gaacgaagat gaaatccaga aaatggtacg cgacgcagaa 1560
gctaacgccg aagctgaccg taagtttgaa gagctggtac agactcgcaa ccagggcgac 1620
catctgctgc acagcaccg taagcaggtt gaagaagcag gcgacaaact gccggtgac 1680
gacaaaactg ctatcgagtc tgcgctgact gcactggaaa ctgctctgaa aggtgaagac 1740
aaagccgcta tcgaagcgaa aatgcaggaa ctggcacagg tttcccagaa actgatggaa 1800
atgcccagc agcaacatgc ccagcagcag actgccggtg ctgatgcttc tgcaaacac 1860
gcgaaagatg acgatgttgt cgacgtgaa ttgaagaag tcaaagacaa aaaataa 1917

<210> 3

<211> 55

<212> DNA

<213> synthetic DNA

<400> 3

gcggatccat cgagggtaga ggtgacgtaa aagacgtact gctgctggac gttac 55

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> synthetic DNA

<400> 4

ttatTTTTtG tctttgactt cttcaaattc agc 33

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> synthetic DNA

<400> 5

gccggctgac gactaaactg ctatcgagtc 30

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> synthetic DNA

<400> 6

gactcgatag cagtttagtc gtcagccggc 30

<210> 7

<211> 27

<212> DNA

<213> synthetic DNA

<400> 7

tgctctgaaa ggtaagaca aagccgctat 27

<210> 8

<211> 27

<212> DNA

<213> synthetic DNA

<400> 8

atagcggctt tgtcttaacc tttcagagca 27

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> synthetic DNA

<400> 9

gcagcaacat gcctaacagc agactgccgg 30

<210> 10

<211> 30

<212> DNA

<213> synthetic DNA

<400> 10

ccggcagict gctgttaggc atgttgctgc 30

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> synthetic DNA

<400> 11

ccttcgatat cggtgctgtc ggtatcctgc 30

<210> 12

<211> 30

<212> DNA

<213> synthetic DNA

<400> 12

gcaggatacc gacagcaacg atatcgaagg 30

<210> 13

<211> 27

<212> DNA

<213> synthetic DNA

<400> 13

tctggatcca acgaagatga aatccag 27

<210> 14

<211> 30

<212> DNA

<213> synthetic DNA

<400> 14

gcggatccgc tgaccgtaag tttgaagagc 30

<210> 15

<211> 29

<212> DNA

<213> synthetic DNA

<400> 15

ccggatcccc gaccaagcac agccaggtg 30

<210> 16

<211> 29

<212> DNA

<213> synthetic DNA

<400> 16

attaactatg agaggatccc atcaccatc 29

<210> 17

<211> 29

<212> DNA

<213> synthetic DNA

<400> 17

gatggatgatg ggatcctctc atagttaat 29

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/009785

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K14/245, C07K1/14, C12P21/02, A61K47/42,
G01N33/543//G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07K14/245, C07K1/14, C12P21/02, A61K47/42, G01N33/543,
G01N33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 6-66803 A (Becton Dickinson and Co.), 11 March, 1994 (11.03.94), All references & EP 575998 A1 & US 5399500 A	1
A	Peterfi Z., Kocsis B., "Comparison of blocking agents for an ELISA for LPS", J.Immunoassay, 2000 November, 21(4), pp341-54	1

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
17 September, 2004 (17.09.04)

Date of mailing of the international search report
12 October, 2004 (12.10.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/009785

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 2-7
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
(See extra sheet.)

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
(See extra sheet.)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1 to 7

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box No.II-2 of continuation of first sheet(2)

The inventions as set forth in claims 2 to 4 relate to arbitrary proteins obtained by the screening method according to claim 1 and, further, fulfilling specific requirements.

The inventions as set forth in claims 5 to 7 relate to arbitrary proteins fulfilling the requirements A to C as set forth in claim 1.

However, only several examples of the proteins as set forth in claims 2 to 7 are presented in the description. Thus, claims 2 to 7 are neither supported by the description nor disclosed therein. Even though the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, it is completely unknown what compounds falls under the category thereof and what are not.

Such being the case, no meaningful search can be made on the inventions as set forth in the above claims.

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

Claim 1 is an independent claim relating to a method of screening a protein or a partial sequence protein having a blocking ability based on amino acid sequence data that fulfills specific requirements.

Claim 8 is an independent claim relating to a protein originating in "HSP70 family protein" and achieving an improved blocking efficiency.

Claim 17 is an independent claim relating to a protein for blocking which is a protein for blocking having at least one hydrophilic domain and at least one hydrophobic domain and in which the hydrophobic domain can be adsorbed by a container wall and the hydrophilic domain can coat the hydrophobic domain adsorbed by the container wall.

The claim 18 is an independent claim relating to a modified protein having a blocking speed elevated compared with BSA.

As the results of the search, however, it is found out that a protein having a blocking ability is not novel since such proteins have already been disclosed by JP 6-66803 A (Becton Dickinson and Co.), 11 March, 1994 (11.03.94), Peterfi Z, Kocsis B, "Comparison of blocking agents for an ELISA for LPS", J. Immunoassay, 2000 November, 21(4), pages 341 to 54.

As a result, the protein having a blocking ability falls within the category of prior art and, therefore, this common matter is not a special technical feature in the meaning within the second sentence of PCT Rule 13.2.

Accordingly, there is no matter common to the independent claims 1, 8, 17 and 18.

Since there is no matter common to the independent claims 1, 8, 17 and 18 seemingly being a special technical feature in the meaning within the second sentence of PCT Rule 13.2, no technical relevancy can be found in the meaning within PCT Rule 13 among these inventions differing from each other.

Such being the case, it is obvious that the independent claims 1, 8, 17 and 18 do not comply with the requirement of unity of invention.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07K14/245, C07K1/14, C12P21/02, A61K47/42, G01N33/543 // G01N33/50

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07K14/245, C07K1/14, C12P21/02, A61K47/42, G01N33/543, G01N33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 6-66803 A (ベクトン・ディッキンソン・アンド・カンパニー), 1994. 03. 11, 文献全体 &EP 575998 A1 &US 5399500 A	1
A	Peterfi Z, Kocsis B, "Comparison of blocking agents for an ELISA for LPS", J. Immunoassay, 2000 Nov, 21(4), pp341-54	1

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17. 09. 2004

国際調査報告の発送日

12.10.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田中 耕一郎

4B

9636

電話番号 03-3581-1101 内線 3446

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☒ 請求の範囲 2-7 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

(特別ページ参照)
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

(特別ページ参照)

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

1-7

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

●第II欄の続き

請求の範囲2-4に記載された発明は、請求項1のスクリーニング方法によって得られ、更に所定の条件を満たす任意のタンパク質に関するものである。

請求の範囲5-7に記載された発明は、請求項1に記載のA乃至Cの条件を満たす任意のタンパク質に関するものである。

しかしながら、明細書には請求の範囲2-7に記載されたタンパク質として、数例が記載されているのみである。よって、請求の範囲2-7は明細書による裏付けを欠き、開示も欠いている。また出願時の技術常識を勘案しても、いかなるタンパク質が該当するのか全く不明である。

よって、前記請求の範囲に記載された発明について、有意義な調査ができない。

●第III欄の続き

独立した請求の範囲1は、アミノ酸配列情報を元にブロッキング能を有するブロッキング用タンパク質もしくは部分配列タンパク質をスクリーニングする方法であって、所定の条件を満たす方法に関するものである。

独立した請求の範囲8は、「HSP70ファミリータンパク質」由来であるブロッキング効率の向上したタンパク質に関するものである。

独立した請求の範囲17は、1以上の親水性ドメインと1以上の疎水性ドメインを有するブロッキング用タンパク質であって、疎水性ドメインが器壁に吸着可能であり、親水性ドメインが器壁に吸着した疎水性ドメインを覆うことが可能であるブロッキング用タンパク質に関するものである。

独立した請求の範囲18は、ブロッキング速度がBSAよりも向上している改変されたタンパク質に関するものである。

しかしながら、調査の結果、ブロッキング能を有するタンパク質は、JP 6-66803 A (ベクトン・ディッキンソン・アンド・カンパニー), 1994.03.11, Peterfi Z, Kocsis B, "Comparison of blocking agents for an ELISA for LPS", J. Immunoassay, 2000 Nov, 21(4), pp341-54に開示されているから、新規でないことが明らかになった。

結果として、当該ブロッキング能を有するタンパク質は、先行技術の域を出ていないから、PCT規則13.2の第2文の意味においてこの共通事項は特別な技術的特徴ではない。

したがって、独立した請求の範囲1、8、17、18において共通の事項はない。

また、独立した請求の範囲1、8、17、18において、PCT規則13.2の第2文の意味において特別な技術的特徴と考えられる他の共通の事項は存在しないので、それらの相違する発明の間にPCT規則13の意味における技術的な関連を見いだすことができない。

よって、独立した請求の範囲1、8、17、18は、発明の単一性の要件を満たしていないことが明らかである。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINE(S) OR MARK(S) ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.